



Universidad Andrés Bello
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela de Ingeniería en
Biotecnología

**REGULACIÓN TEMPRANA DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE LA SINAPSIS
EN EL HIPOCAMPO MEDIANTE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT/ β -catenina.**

Proyecto de Tesis presentado como parte de los requisitos para
optar al Grado de **Magíster en Biotecnología**.

Profesor patrocinante:
Dr. Giancarlo De Ferrari Valentini
Centro de Investigaciones Biomédicas
Facultad de Ciencias Biológicas
Facultad de Medicina
Universidad Andrés Bello

Víctor Manuel Andrade Fuentes

Santiago, Chile.

Enero, 2017.



UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO
Facultad de Ciencias Biológicas
Ingeniería en Biotecnología

**“REGULACIÓN TEMPRANA DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE LA SINAPSIS
EN EL HIPOCAMPO MEDIANTE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT/ β -catenina.”**

Víctor Manuel Andrade Fuentes

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión del Director de Tesis Dr. Giancarlo De Ferrari Valentini, en el laboratorio de Genética y Transducción de Señales, Universidad Nacional Andrés Bello, aprobado por los miembros de la Comisión de evaluación.

Dr. Giancarlo De Ferrari Valentini
Director de Tesis

Dr. Lorena Varela-Nallar
Comisión de Tesis

Dr. Claudio Cabello
Comisión de Tesis

SANTIAGO-CHILE
Año 2017

TABLA DE CONTENIDOS

i.	Agradecimientos	4
ii.	Financiamiento	5
iii.	Abreviaciones	6
iv.	Índice de figuras y tablas	8
1.	Resumen	10
2.	Abstract	11
3.	Introducción	12
3.1.	Vía de señalización Wnt/ β catenina	12
3.2.	RNASeq y enfermedad neurológicas prevalentes	18
4.	Hipótesis	22
5.	Objetivos	22
5.1.	Objetivo General	22
5.2.	Objetivos Específicos	22
6.	Métodos	23
6.1.	Purificación de Wnt3a	23
6.2.	Células y condiciones de cultivo	24
6.2.1.	Cultivo de neuronas hipocampales	24
6.2.2.	Línea celular <i>pBARL-HT22</i>	24
6.3.	Ensayos funcionales con Wnt3a purificado	24
6.4.	Western blot	25
6.5.	RT-PCR en tiempo real	25
6.6.	Secuenciación	26
6.7.	Análisis de categorías ontológicas	31
6.8.	Red de asociaciones funcionales de proteínas (FPAN)	31
6.9.	Búsqueda de módulos	32
7.	Resultados	34
7.1.	<i>WNT3a promueve la estabilización de β-catenina y la expresión de genes canónicos Wnt</i>	34

7.2. Respuesta a tratamientos con WNT3a en el programa transcripcional global.....	34
7.3. Sobre-representación de categorías ontológicas y sus componentes en el interactoma de rata.....	46
Discusión.....	53
Conclusión.....	59
Proyecciones.....	60
Referencias.....	61

i. AGRADECIMIENTOS

A Estefanía Sotelo Pineda, gracias por tu amor y apoyo incondicional siempre. No importa en qué o el lugar en que nos encontremos, siempre vivirás en mí.

Mis padres por todo su esfuerzo y confianza.

Mis grandes amigos, son tantos que quisiera mencionar, pero cada uno sabe quiénes son. Muchas gracias por acompañarme en este proceso.

Por sobre todo, agradezco haber aprendido que la clave del éxito es la colaboración y nunca la competitividad.

ii. FINANCIAMIENTO

Proyecto FONDECYT 1140353 de la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología de Chile (CONICYT), otorgado al Doctor Giancarlo De Ferrari Valentini.

iii. ABREVIACIONES

APC: *Adenomatous Polyposis Coli*

ARN: Ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)

BP: Proceso biológico (*Biological process*)

CA1: Área *Cornu Ammonis* 1

CA3: Área *Cornu Ammonis* 3

cADN: Ácido desoxiribonucleico complementario (*complementary desoxyribonucleic acid*)

CC: Componente celular (*Cellular component*)

CK: Caseína Quinasa (*casein kinase*)

Dvl: *Dishevelled*

EA: Enfermedad de Alzheimer

FPAN: Red de asociación funcional de proteínas (*Functional protein associated network*)

Fzd: *Frizzled*

GO: Ontología de genes (*gene ontology*)

GSK: Glicógeno Sintasa Quinasa (*glycogen synthase kinase*)

LRP: Proteína relacionada al receptor de lipoproteína de baja densidad (*low-density lipoprotein receptor-related protein*)

LTP: Potenciación a largo plazo (*Long term potentiation*)

mARN: Ácido ribonucleico mensajero (*messenger ribonucleic acid*)

MF: Función molecular (*Molecular function*)

ND: Sin datos biológicos (*non-biological data*)

NGS: Experimentos de secuenciación de siguiente generación (*Next generation sequencing*)

NHR: Neurona hipocámpal de rata

NIH: Instituto nacional de salud (*National Institute of Health*)

NMDA: N-metil D-aspartato

PCP: Polaridad celular planar

RIN: Número de integridad de ARN (*RNA integrity number*)

SNP: Polimorfismo de nucleótido simple (*Single nucleotide polymorphism*)

SYN: Sinapsina

SYT: Sinaptotagmina

TCF/LEF: Factor de células T/Factor *enhancer* linfóide (*T-cell factor/lymphoid enhancer factor*)

TSS: Sitio de inicio de la transcripción (*Transcription start site*)

VC: Veces de cambio

VS: Vesícula sináptica

iv. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras:

Figura 1. Vía de señalización Wnt/ β -catenina.....	13
Figura 2. Expresión de componentes de la vía Wnt/ β -catenina en el hipocampo de ratón.....	14
Figura 3. Diagrama de flujo de actividades desarrolladas.....	33
Figura 4. Expresión de genes blanco de la vía Wnt y estabilización de β -catenina en NHR.....	35
Figura 5. Análisis de normalización de lecturas totales para muestras de RNASeq.....	36
Figura 6. Análisis del transcriptoma, expresión diferencial y significancia de genes de rata en presencia de Wnt3a.....	40
Figura 7. Funciones moleculares representadas de genes expresados diferencialmente.....	42
Figura 8. Sobrelapamiento de genes modulados por Wnt/ β -catenina de Manera temprana.....	44
Figura 9. Redes biológicas sobre-representadas en respuesta a Wnt3a.....	48
Figura 10. Módulos enriquecidos con el tratamiento con Wnt3a.....	49
Figura 11. Redes sobre representadas luego del tratamiento con Wnt3a.....	51

Tablas:

Tabla 1. Valores característicos de librerías y estándares de calidad.....	28
Tabla 2. Valores estadísticos del alineamiento de secuencias usando el paquete <i>Bioconductor</i>	29
Tabla 3. Correlación de muestras de rata.....	30
Tabla 4. <i>TOP</i> 20 genes sobre-regulados por Wnt3a nominalmente significativos en neuronas hipocampales de rata.....	43
Tabla 5. Procesos ontológicos sobre representados.....	47
Tabla 6. Categorías <i>TOP</i> 3 sobre representadas en las sub-redes post inducción con Wnt3a.....	52

1. RESUMEN

La vía de señalización Wnt/ β -catenina modula el desarrollo del cerebro y su función. Su desregulación ha sido asociada con distintas patologías neurodegenerativas y del neurodesarrollo. A nivel molecular, regula genes relacionados con la sinapsis, proliferación y diferenciación, entre otros. Debido a que uno de sus principales efectos es la modular genes blanco, nos planteamos la siguiente hipótesis: “La vía de señalización Wnt/ β -catenina regula la expresión temprana de genes relacionados a la sinapsis en el hipocampo”. El objetivo de este trabajo consistió en examinar los cambios en el programa transcripcional global al inducir de forma temprana (4 h) cultivos primarios de neuronas hipocámpales de rata con la proteína Wnt3a purificada. Los resultados obtenidos por RNASeq, permitió la identificación de 170 genes expresados diferencialmente, incluyendo blancos directos regulados por la vía de señalización como *NOTUM*, *AXIN2* y *LEF1*. De igual forma el análisis permitió identificar nuevos candidatos como *FAM84a*, *STK32a* y *ITGA9*. Los principales procesos biológicos enriquecidos entre los genes expresados diferencialmente incluyó categorías ontológicas asociadas con precursores neuronales (GO:0061364, p-adjusted = 2.5×10^{-7}), desarrollo del prosencéfalo (GO:0030900, p-adjusted = 7.3×10^{-7}) y diferenciación de células madre (GO:0048863 p-adjusted = 7.3×10^{-7}). Del mismo modo, la expresión de un número significativo de genes con actividad de factor transcripcional fue inducida (GO:0043565, p-adjusted = 4.1×10^{-6}). Junto a lo anterior se estudió las redes moleculares enriquecidas y se detectó 3 módulos sobre-expresados altamente significativos, los que se encuentran involucrados en procesos metabólicos de glicerolípidos (GO:0046486, p-adjusted = 4.5×10^{-19}), aprendizaje y memoria (GO:0007611, p-adjusted = 4.0×10^{-5}) y secreción de neurotransmisores (GO:0007269, p-adjusted = 5.3×10^{-12}). Nuestros resultados sugieren que Wnt/ β -catenina controla múltiples procesos biológicos relacionados con la estructura neuronal y su actividad, los cuales se ven afectados en distintos trastornos que presentan disfunción sináptica.

2. ABSTRACT

Wnt/ β -catenin signaling modulates brain development and function and its deregulation underlies pathological changes occurring in neurodegenerative and neurodevelopmental disorders. Since one of the main effects of Wnt/ β -catenin signaling is the modulation of target genes, in the present work we examined global transcriptional changes induced by short-term Wnt3a treatment (4 h) in primary cultures of rat hippocampal neurons. RNASeq experiments allowed the identification of 170 differentially expressed genes, including known Wnt/ β -catenin target genes such as *NOTUM*, *AXIN2* and *LEF1*, as well as novel candidates *FAM84a*, *STK32a* and *ITGA9*. Main biological processes enriched with differentially expressed genes included neural precursor (GO:0061364, p-adjusted = 2.5×10^{-7}), forebrain development (GO:0030900, p-adjusted = 7.3×10^{-7}) and stem cell differentiation (GO:0048863 p-adjusted = 7.3×10^{-7}). Likewise, following activation of the signaling cascade, the expression of a significant number of genes with transcription factor activity was induced (GO:0043565, p-adjusted = 4.1×10^{-6}). We also studied molecular networks enriched upon Wnt3a activation and detected three highly significant expression modules involved in glycerolipid metabolic process (GO:0046486, p-adjusted = 4.5×10^{-19}), learning or memory (GO:0007611, p-adjusted = 4.0×10^{-5}) and neurotransmitter secretion (GO:0007269, p-adjusted = 5.3×10^{-12}). Our results suggest that Wnt/ β -catenin mediated transcription controls multiple biological processes related with neuronal structure and activity that are affected in synaptic dysfunction disorders.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. *Vía de Señalización Wnt/ β -catenina.*

Hasta la fecha se ha descubierto 19 genes que codifican para ligandos Wnts, los cuales son altamente conservados en mamíferos (Amerongen y Nusse, 2009). Estas glicoproteínas participan en cascadas de señalización que comienzan con la unión de Wnt con sus receptores de transmembrana, pertenecientes a la familia Fzd (Frizzled). La unión del ligando puede resultar en 3 vías diferentes: vía Wnt/ Ca^{2+} , vía de polaridad celular planar (PCP) ó vía de señalización Wnt/ β -catenina o canónica (Clevers y Nusse, 2012; Moon et al., 2004, Staal et al., 2008). Esta última vía de señalización comienza con la unión de Wnt a Fzd y correceptores pertenecientes a las proteínas relacionadas a los receptores para lipoproteína de baja densidad 5/6 (LRP5/6, por su sigla en inglés; He et al., 2004). A continuación, la proteína Dishevelled (Dvl), inhibe al “complejo de destrucción” constituido por las proteínas Axina, poliposis adenomatosa coli (APC; Lipina et al., 2011), caseína quinasa 1 (CK1) y la enzima glicógeno sintasa quinasa 3β (GSK3 β ; Hart et al., 1998). Al encontrarse el complejo macromolecular activo, Axina y APC facilitan la fosforilación de β -catenina a través de CK1 y GSK3 β , la que luego será marcada para su degradación por la vía ubiquitina-proteosoma (Aberle et al., 1997; Hart et al., 1998; Nusse, 2012). La inhibición de éste complejo de destrucción, por lo tanto, evita que β -catenina sea degradada, con lo cual aumenta en el citoplasma y luego transloca al núcleo, en donde se asocia con factores de transcripción de la familia TCF/LEF y activa la expresión de genes blanco de la vía (Figura 1) (Budnik y Salinas, 2010; Moon et al., 2004).

La vía de señalización Wnt/ β -catenina, junto a sus componentes, se expresan y participan en diferentes regiones del cerebro durante el desarrollo, incluyendo el bulbo olfatorio, la corteza frontal, cerebelo e hipocampo (Figura 2) (Grove et

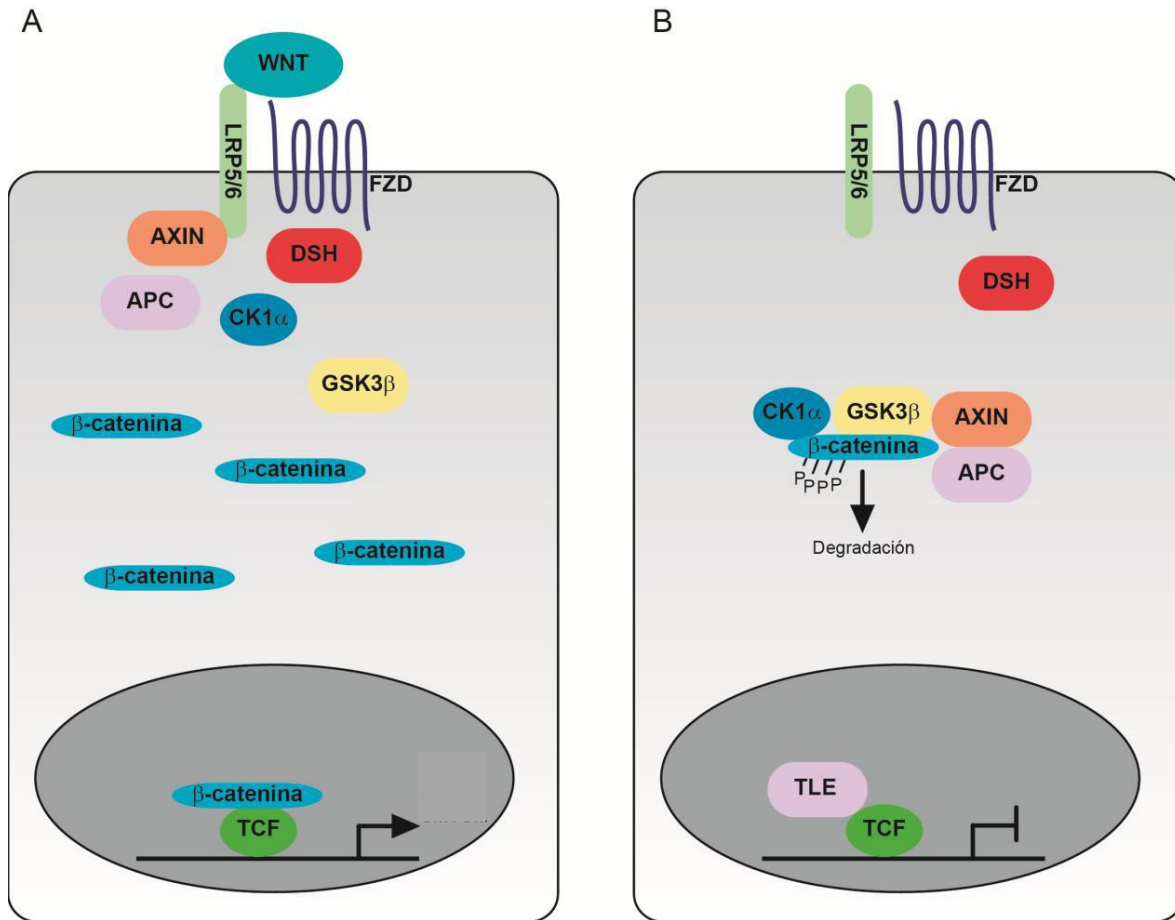


Figura 1. Vía de señalización Wnt/β-catenina. (A) En estado activa, la interacción del ligando Wnt a sus receptores permite el reclutamiento, por la proteína DSH, del complejo de destrucción de β-catenina, compuesto de CK1α, GSK3β, AXIN y APC. A continuación, el complejo no es capaz de ubiquitinar a β-catenina, la que se acumula en el citoplasma y posteriormente transloca al núcleo, en donde desplazada al represor TLE y se une a factores de transcripción de la familia TCF/LEF, regulando la expresión de genes blancos. (B) En estado inactiva, no hay interacción del ligando Wnt con sus receptores transmembrana. Esto da lugar al reclutamiento de β-catenina por su complejo de destrucción y su fosforilación por las proteínas CK1α y GSK3β. En su estado fosforilado β-catenina es ubiquitinada y posteriormente degradada mediante la vía Ubiquitina proteosoma.

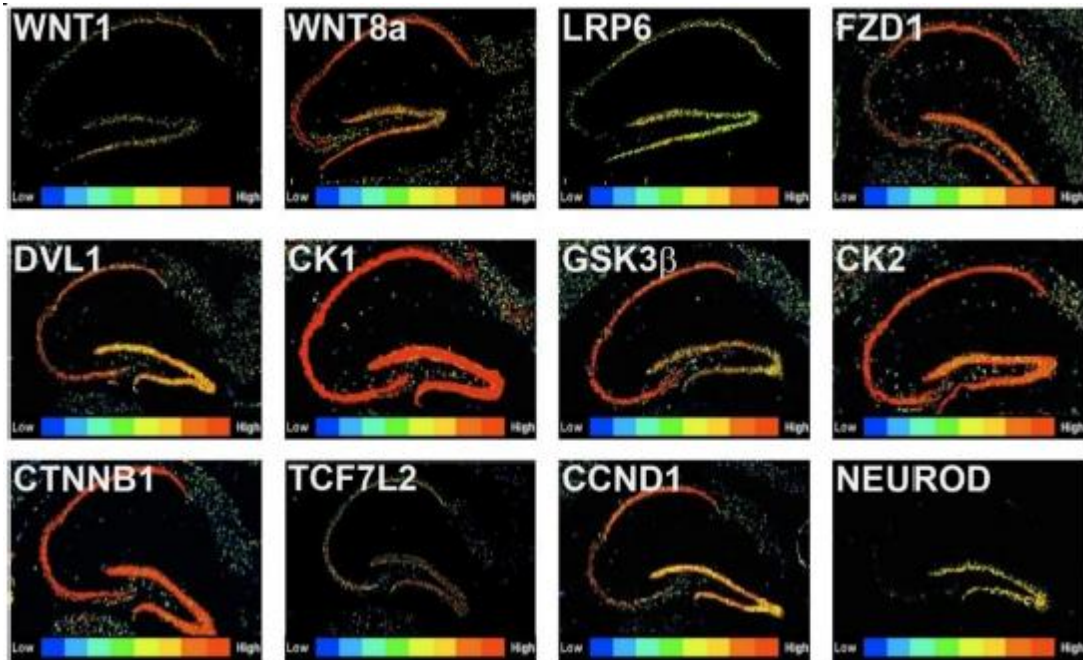


Figura 2. Expresión de componentes de la vía Wnt/ β -catenina en el hipocampo de ratón. Hibridación *in situ* de los ARN mensajero de ligandos (WNT1 y WNT8a), receptores y co-receptores (FZD1 y LRP6, respectivamente), componentes del complejo de destrucción (DVL1, CK1, CK2 y GSK3 β) y nucleares (TCF7L2) que participan en la vía de señalización Wnt/ β -catenina, así como su efector (CTNNB1) y genes blancos de la vía (CCND1 y NEUROD). Datos de Allen Brain Map (<http://www.brain-map.org/>).

al., 1998; Houart et al., 2002; Lee et al., 2000; Maretto et al., 2003; Zhou et al., 2004). En estas regiones cerebrales, de entre los ligandos Wnt conocidos, se ha reportado que Wnt3a es secretado de manera paracrina por astrocitos (Lie et al., 2005). Así también, existen antecedentes de que es liberado por neuronas hipocámpales (Chen et al., 2006; Lie et al., 2005), regulando procesos como: i) la neurogénesis adulta (Lie et al., 2005; Wisniewska 2013), ii) plasticidad neural (Budnik y Salinas, 2011; Wisniewska 2013), iii) desarrollo, morfogénesis y maduración sináptica (Ahmad-Annur et al., 2006; Budnik y Salinas, 2011; Ciani et al., 2011; De Ferrari e Inestrosa, 2000; De Ferrari y Moon, 2006; De Ferrari et al., 2014; Inestrosa y Arenas, 2010; Yu y Malenka, 2003), iv) remodelamiento axonal (Hollis y Zou, 2012; Takeichi y Abe, 2005) y, v) la transmisión sináptica excitatoria mediada por receptores NMDA (N-metil D-aspartato), modulando los niveles de calcio intracelular y promoviendo la LTP (potenciación a largo plazo, por su sigla en inglés *Long Term Potentiation*; Arrázola et al., 2009; Ávila et al., 2010; Cerpa y Gambril, 2011; Chen et al., 2006; Ciani et al., 2011; Tabatadze et al., 2012).

Del mismo modo, Wnt1, Wnt3a, Wnt7a y Wnt8 son ligandos conocidos por activar la vía de señalización Wnt/ β -catenina, participando durante el desarrollo cerebral y la sinaptogénesis (Caricasole et al., 2003; Ettenberg et al., 2010; Itasaki et al., 2003). Wnt7a y Wnt8a, al igual que Wnt3a, regulan la formación de sinapsis excitatorias. (Ahmad-Annur et al., 2006; Sharma et al., 2013). Más aun, un estudio reciente, ha sugerido que LRP6 es crítico para el desarrollo de sinapsis funcionales *in vivo* (Sharma et al., 2013). En este contexto, dados los múltiples roles de la vía de señalización Wnt/ β -catenina en la función sináptica y los procesos homeostáticos cerebrales, es que consideramos su regulación como candidata funcional para el entendimiento de los complejos moleculares asociados a condiciones neurológicas prevalentes complejas en la población humana (Caracci et al., 2016; De Ferrari e Inestrosa, 2000; De Ferrari y Moon, 2006; De Ferrari et al., 2014).

A nivel pre-sináptico, Wnt7a y Wnt3a - ambos ligandos canónicos - también han

probado mejorar el agrupamiento y reciclaje de las vesículas sinápticas (VSs) en cultivos primarios de neuronas hipocámpales de rata (Cerpa et al., 2008). De manera consistente, la pérdida de función de Wnt7a inhibe la agrupación de VSs, efecto similar a lo que ocurre con la pérdida de función de la proteína Dishevelled 1 (Dvl1), la cual actúa río abajo en la señalización de los ligandos Wnt (Ciani et al., 2011). Es interesante mencionar que también se ha reportado que dobles mutantes de *Wnt7a/Dvl1* afectan el desarrollo de la morfología de espinas sinápticas y su capacidad de efectuar neurotransmisión (Ahmad-Annuar et al., 2006), lo cual explicaría un comportamiento anómalo debido a un ensamblaje pre-sináptico defectuoso, junto a un desbalance de sinapsis excitatorias e inhibitorias. La vía de señalización Wnt canónica, también promueve la liberación de neurotransmisores y el tráfico de VSs modulando fosfoproteínas asociadas a estas. Wnt7a y Wnt3a promueven la agrupación (Hall et al., 2000) y fosforilación (Ávila et al., 2010) de Sinapsina 1 (SYN1, por su sigla en inglés) en el botón sináptico previo a la liberación de neurotransmisores. DVL1 forma parte en este proceso mediante unión directa con Sinaptotagmina 1 (SYT1, por su sigla en inglés) en neuronas diferenciadas (Kishida et al., 2007). Del mismo modo, el ligando Wnt7a promueve el aumento de los niveles proteicos de SYN1 en el cerebelo (Hall et al., 2000). También se ha descrito su capacidad de aumentar la liberación de neurotransmisores en sinapsis de las regiones CA3 y CA1, por medio de un incremento en las corrientes excitatorias postsinápticas en miniatura (mESPC, por su sigla en inglés) (Cerpa et al., 2008). Del mismo modo, se ha visto que Wnt3a y Wnt7a son capaces de aumentar la densidad y promover el proceso de maduración de espinas sinápticas en el hipocampo (Cerpa et al., 2008; Ciani et al., 2011; Davis et al., 2008). Por último, se ha descrito que el receptor Fzd1 es activado por el ligando Wnt3a en neuronas hipocámpales donde participa en la diferenciación sináptica (Varela-Nallar et al., 2009), dando así cuenta del rol que esta proteína tiene en la sinapsis.

Los procesos de aprendizaje y memoria son altamente dependientes de la transmisión sináptica y modulados principalmente por vías de señalización

asociadas al flujo de Ca^{2+} intracelular. En este contexto, las vías Wnt canónicas y no canónicas han sido relacionadas con la homeostasis y señalización por Ca^{2+} (Ávila et al., 2010; Cerpa et al., 2011; Ciani et al., 2011; Varela-Nallar et al., 2010). Se ha reportado que los ligandos como Wnt3a (Ávila et al., 2010), Wnt5a (Varela-Nallar et al., 2010) y Wnt7a (Ciani et al., 2011) tienen un rol como efectores funcionales del influjo de Ca^{2+} a nivel neuronal. Entre otros mecanismos moleculares involucrados en la modulación de la actividad de terminales sinápticos, también se destaca la participación de proteínas de adhesión celular en las interacciones trans-sinápticas (por ejemplo, de las proteínas N-caderina y β -catenina), las cuales participan de forma esencial durante el reclutamiento y agrupación de VSs en las sinapsis (Bamji et al., 2003; Iwai et al., 2002; Jüngling et al., 2006; Sun et al., 2009; Togashi et al., 2002). Adicionalmente a los efectos mencionados sobre la función sináptica, en conjunto con los procesos de control biológico de la polaridad neuronal y el remodelamiento axonal hasta lograr establecer sinapsis maduras, contemplan varios cambios post traduccionales, los cuales ocurren rápida y constantemente en la maquinaria del citoesqueleto neuronal para ser logradas (Oliva et al., 2013; Salinas, 2012). Del mismo modo, varios reportes han mostrado la función de la vía de señalización Wnt/ β -catenina en desórdenes neurológicos prevalentes asociados con una disrupción y disfunción sináptica, entre los que se destacan desórdenes del espectro autista, la enfermedad de Alzheimer, epilepsia o esquizofrenia (Caracci et al., 2016; De Ferrari y Moon, 2006; De Ferrari et al., 2014; Huang et al., 2015; Inestrosa et al., 2012).

3.2. ***RNASeq y enfermedades neurológicas prevalentes.***

Los experimentos de secuenciación de siguiente generación (NGS, por su sigla en inglés), particularmente, la secuenciación masiva de ARN ha revolucionado el modo en que estudiamos el transcriptoma e impulsado el desarrollo de nuevas herramientas para su análisis (Wang et al., 2010). El integrar los genes expresados diferencialmente en redes biológicas ha permitido caracterizar la información obtenida de este tipo de experimentos con otras OMICAs, entregando una visión más amplia del contexto transcripcional de un modelo específico, rama conocida actualmente como biología de sistemas (Parikshak et al., 2015). Debido al exceso de tiempo consumido con análisis gen por gen en grupos de datos extensos, con más de miles genes expresados diferencialmente, algunas alternativas han sido generadas para llevar a cabo la búsqueda de módulos enriquecidos en redes biológicas, ofreciendo una manera complementaria, sencilla y directa de observar componentes celulares o vías asociadas con al algún contexto funcional específico (Parikshak et al., 2015).

La mayoría de los estudios que buscan analizar el programa transcripcional global a nivel cerebral han sido realizados en modelos animales (Guryev et al., 2008; Henrichsen et al., 2009), sin embargo, en los últimos años algunos nuevos estudios han expandido esta caracterización del transcriptoma a tejido humano, con un amplio número de muestras, permitiendo un apropiado uso de poder estadístico en sus análisis (Colantuoni et al., 2011; Hawrylycz et al., 2012; Kang et al., 2011). Colantuoni y sus colaboradores examinaron las dinámicas temporales del transcriptoma en la corteza pre-frontal en distintas etapas del desarrollo. Entre sus hallazgos, se reportó una tasa de cambio en la expresión de diversos genes, destacando cambios rápidos y progresivos, principalmente durante el desarrollo fetal, destacándose el punto más importante como el nacimiento. Por otra parte, las investigaciones del equipo de Kang, estudiaron variaciones transcripcionales espaciales y temporales del cerebro durante distintas etapas del desarrollo y la vida adulta, estimando la asociación entre

polimorfismos genéticos y la expresión de genes. Entre las principales diferencias observadas, los cambios más importantes se observaron en la expresión en el tejido de la corteza en comparación con las demás regiones del cerebro. Del mismo modo que Colantuoni, los mayores cambios dados durante el desarrollo se observan en el paso del estadio fetal al nacimiento y la vida adulta, destacando por ejemplo grupos de genes asociados con desarrollo de procesos sinápticos y con proliferación. Lo anterior, reflejaría el dinámico remodelamiento celular durante el desarrollo cerebral. Por último, el grupo de Hawrylycz generó un atlas transcripcional del cerebro humano de muestras en más de cien zonas definidas anatómicamente del cerebro humano de dos individuos. En conjunto, estos estudios, basados en técnicas de microarreglos, buscan direccionar aspectos fundamentales de la variación de los ARN mensajeros en distintas regiones del cerebro humano bajo condiciones normales, durante el desarrollo y en la senescencia, permitiendo una visión complementaria a la regulación genética que sufren en estos estadios y, ayudando así a un mayor entendimiento de las dinámicas de regulación de los mecanismos moleculares asociados.

En nuestro laboratorio se realizó un meta-análisis de asociación a nivel de genoma completo en la enfermedad de Alzheimer. Los resultados de este estudio han sido interpretados mediante métodos de biología de sistemas. Con esta aproximación se ha obtenido una lista de 20 genes, a los que se observó su patrón de expresión en hipocampo humano, obteniéndose 2 *clusters* de alta y baja expresión relacionados con sinapsis glutamatergica (Pérez et al., 2014). Los resultados anteriores comparten similitud con estudios previos de casos Alzheimer en contraste con casos control, los cuales han revelado que diversas regiones del cerebro, entre otras, la capa CA1 en el hipocampo, presentan perfiles de expresión disímiles de receptores glutamatergicos ionotrópicos y metabotrópicos (Albasanz et al., 2005; Aronica et al., 1998; Dewar et al., 1991; Lee et al., 2004; Pellegrini-Giampietro et al., 1994; Williams et al., 2009; Yasuda et al., 1995).

Hasta la fecha, sabemos que los ligandos pertenecientes a la vía de

señalización Wnt/ β -catenina tienen un rol funcional al modular las terminales sinápticas, sin embargo, no se ha evaluado su regulación en el programa transcripcional neuronal. Finalmente, el estudio del programa genético global mantenido y regulado por los complejos de β -catenina/TCF-LEF en las células neuronales, podría proveer de antecedentes asociados con la actividad de los principales mecanismos moleculares involucrados en la estructura y función de redes y circuitos sinápticos, campo que ha tenido sorprendentemente poca atención hasta la fecha. Frente al nuevo desarrollo de tecnologías de biología de sistemas, en conjunto con los análisis de tecnologías de secuenciación masiva, como RNASeq, hoy podemos integrar la información de genes expresados diferencialmente dentro de redes biológicas, las cuales nos provean de una visión mucho más amplia de los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo morfológico y funcional de los terminales sinápticos de un linaje celular específico. Considerando además que nuestro grupo de trabajo y otros han observado el comportamiento de la activación de esta cascada de señalización al corto plazo de inducción (2-6 h) (Gujral y MacBeath, 2010; Medina et al., 2015; Nuñez et al., 2011; Ugarte et al., 2015; Wexler et al., 2011), es que nos propusimos la generación de una batería de información de datos transcripcionales y realización de los análisis previamente descritos para indagar en qué redes biológicas se encuentran genes expresados diferencialmente al incubar cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata por 4 h con Wnt3a purificado. Esperamos que al obtener un perfil del programa genético mantenido por los complejos β -catenina/TCF-LEF en células hipocampales nos permita ayudar a entender el funcionamiento de los mecanismos moleculares asociados a la actividad, estructura y función de redes y circuitos sinápticos en la región hipocampal, la cual es afectada en varios desordenes neurodegenerativos y del neurodesarrollo. De igual modo, esperamos que nuestros resultados se condigan con los trabajos discutidos previamente, potenciando el rol funcional de la vía Wnt/ β -catenina en módulos asociados con plasticidad sináptica, sugiriendo que una alterada formación y función sináptica, modulados por esta vía de señalización, tendría un impacto trascendental en la sintomatología de desórdenes neurológicos

prevalentes (Baranzini et al., 2009; Johnson et al., 2015; Krumm et al., 2014; Pérez-Palma et al., 2014), idea que ha recibido bastante interés de la comunidad científica recientemente (Duman y Argajanian, 2012; Mandolesi et al., 2015; Sheng et al., 2012; Zoghgi y Bear, 2012). En consideración de los antecedentes previamente descritos, nos formulamos la hipótesis de este trabajo, titulada “***La vía de señalización Wnt/ β -catenina regula la expresión temprana de genes relacionados a la sinapsis en el hipocampo***”.

4. HIPOTESIS

“La vía de señalización Wnt/ β -catenina regula la expresión temprana de genes relacionados a la sinapsis en el hipocampo”.

5. OBJETIVOS

- 5.1. **Objetivo General:** Analizar el patrón de expresión diferencial global temprano de genes regulados por la vía de señalización Wnt/ β -catenina en neuronas hipocampales.
- 5.2. **Objetivos Específicos:**
1. Evaluar el programa transcripcional global posterior a la activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina, utilizando el ligando purificado WNT3a por 4 horas en células de cultivo primario hipocampal de rata.
 2. Estudiar la sobrerrepresentación de categorías ontológicas reguladas por la vía Wnt/ β -catenina, utilizando los resultados de expresión diferencial transcripcional.
 3. Evaluar módulos de interacción redes de los genes regulados diferencialmente, integrando la data transcripcional contra el interactoma de la especie utilizada.

6. MÉTODOS

6.1. *Purificación de Wnt3a*—La purificación de la proteína Wnt3a fue llevada a cabo siguiendo el protocolo previamente descrito por Willert y colaboradores (2003), el que ha sido implementado en nuestro laboratorio siguiendo los cambios sugeridos por el grupo de Kishida (2004). En breve, células L, capaces de secretar Wnt3a fueron obtenidas de ATCC (CRL-2647; Rockville, MD). El medio condicionado Wnt3a (MC-Wnt3a), producido por células L de ratón que sobre expresan esta proteína, fue ajustado con 1% Tritón X-100 y filtrado en un Corning Bottle Top Filter 0,22 μ m (Corning). A continuación, el medio fue aplicado a una columna HiTrap Blue HP (GE Healthcare), previamente equilibrada con buffer de unión (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% CHAPS, 150 mM KCl). Posteriormente, se lavó la columna con el buffer de unión y se eluyó utilizando buffer de unión que contiene KCl 1,5 M, a un flujo de 1 m/min. La presencia de la proteína Wnt3a fue detectada mediante el uso de un anticuerpo anti-Wnt3a (R & D Systems, Minneapolis, MN), y las fracciones positivas fueron agrupadas y concentradas en un Amicon Ultra Centrifugal Filter Device (Millipore). El concentrado fue aplicado a una columna HiLoad 16/60 Superdex 200 (Amersham Biosciences), anteriormente equilibrada con PBS 1X y 1% CHAPS. La elución se realizó a un flujo de 1 ml/min con el mismo buffer usado para equilibrar esta columna y se colectaron fracciones de 1 ml. Las fracciones que resultaron positivas para Wnt3a fueron agrupadas y aplicadas a una columna HiTrap Heparin HP (GE Healthcare), equilibrada con PBS 1X y 1% CHAPS. Luego de lavar la columna con el mismo buffer empleado en equilibrarla, la elución fue realizada con un gradiente lineal de NaCl (0 a 1 M) en PBS 1X y CHAPS 1%, a un flujo de 0,5 ml/min, colectando fracciones de 0,5 ml. Se determinó qué fracciones presentan Wnt3a mediante western blot y éstas fueron agrupadas para su posterior uso. La pureza fue estimada mediante la metodología de SDS-PAGE (8%), teñido con Azul de Coomassie G250, y posteriormente analizada a través de densitometría con el programa ImageJ.

6.2. Células y condiciones de cultivo:

6.2.1. *Cultivo de neuronas hipocampales*—Los animales fueron tratados y manipulados de acuerdo a las directrices recomendadas por el NIH (*National Institute of Health*, Maryland, USA) y el Comité de Bioética de la Universidad Andrés Bello. Las neuronas hipocampales fueron disgregadas y mantenidas como ya se ha descrito previamente (Aguayo y Pancetti. 1994). Brevemente, se tomó las células desde ratas *Sprague-Dawley* preñadas por 18 días y se mantuvo por 14 días *in vitro* (DIV) en placas de cultivo de 12 pocillos (500.000 células por pocillo) tratadas con poli-L-lisina (Sigma). Se incubó las neuronas con medio Neurobasal suplementado con B27 (Gibco). El cultivo se mantuvo a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. El medio se cambió cada 2 días.

6.2.2. *Línea celular pBARL-HT22*—Se cultivó las neuronas hipocampales de ratón, pBARL-HT22, en placas de 10 cm. Cada placa conteniendo un volumen final de 10 mL de medio DMEM (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Gibco) y un 1% de penicilina/estreptomicina. Se mantuvo las células por 48 h previo a los tratamientos, a 37 °C, 5% de CO₂, obteniendo una confluencia entre 80 y 90%.

6.3. *Ensayos funcionales con Wnt3a purificado*—Se incubó con la proteína Wnt3a purificada las células de cultivo primario de hipocampo de rata (14 DIV) y células de línea hipocampal de ratón (pBARL-HT22), respectivamente, por su capacidad de estabilizar β -catenina. Se trató las células de cultivo primario hipocampal de rata (NHR) y pBARL-HT22 con 400 ng/mL de Wnt3a por 4 y 24-h, respectivamente, con el fin de evaluar la respuesta temprana del programa transcripcional global en el modelo de NHR, y la capacidad de activación de la vía Wnt canónica en la línea de ratón. Se evaluó la actividad de Wnt3a en la línea celular pBARL-HT22, un modelo derivado de ratón transfectado de forma estable con el plasmido reportero pBARL (luciferasa de luciérnaga activada por β -catenina), el cual contiene 12 elementos de respuesta a factores de transcripción de la familia TCF/LEF

(Biechele, 2008). Se incubó las células pBARL-HT22 con diferentes tratamientos y luego de 24 h la actividad luciferasa fue cuantificada con el kit *dual luminescence* (Promega, Madison, WI), como se ha descrito previamente (De Ferrari et al., 2007), en el equipo Victor3 (PerkinElmer Life Sciences).

6.4. *Western blot*—Se separó las proteínas mediante la metodología de SDS-PAGE por su tamaño en un gel al 10% y posteriormente se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad). La membrana se bloqueó con leche al 5% en una solución tampón de fosfato salino 1X (PBS, contiene cloruro de sodio 137.0 mM, fosfato de sodio 10.0 mM, cloruro de potasio 2.7 mM y fosfato de potasio 1.8 mM, pH 7.4) y 0.1% del detergente Tween 20, por 1 h con agitación, luego, incubadas con los anticuerpos primarios anti- β -catenina o β -actina (ambos de Santa Cruz Biotechnology), toda la noche a 4°C. Se prosiguió con los lavados correspondientes y se incubó con un anticuerpo secundario adecuado, el cual se encuentra conjugado con peroxidasa de rábano (Santa Cruz Biotechnology) por 1 h a temperatura ambiente. La inmuno reactividad de los anticuerpos fue detectada utilizando reactivos femto-quimioluminiscentes (*SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity*, Promega) y se registró en diferentes tiempos de exposición según la proteína analizada.

6.5. *RT-PCR en tiempo real*—El ARN total se purificó en condiciones libres de ARNasa, utilizando el reactivo TRIZOL (Invitrogen). Se retro-transcribió 2 mg de ARN en una reacción de 10 μ L con el kit de síntesis de cADN *Affinity Script* (Stratagene, CA, USA). En breve, se utilizó 5 μ L del *mix* maestro para generar la primera hebra, 300 ng/ μ L de partidores al azar y 0.5 μ L del *mix* de enzima RT/ARNasa *Block* de *Affinity Script*. Se incubó la reacción a 25 °C por 5 min, luego 42 °C por 45 min, seguido por la inactivación de la enzima por calor a 95°C por 5 min. El cADN fue guardado a -20 °C hasta su posterior utilización. Se evaluó los niveles del *mARN* de *Ccnd1* y *Nlgn3*. Los cADNs fueron analizados mediante PCR en tiempo real; se diseñó los partidores para tener una temperatura de hibridación de ~60 °C y la generación de un amplicón de 100 – 200 pares de bases (pb) de

largo. Se evaluó los partidores utilizando el programa *Primer Blast* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) sin mostrar ninguna secuencia homóloga significativa más que la del producto buscado. A continuación, se midió los niveles de transcrito de los genes seleccionados por qPCR usando el *Mix maestro Brilliant SYBR Green* (Applied Biosystems, CA, USA) y analizados en un equipo Mx3000p (Stratagene, CA, USA). Cada reacción se realizó en duplicado en un volumen de reacción de 20 µL. Todas las reacciones contenían una concentración equimolar de cada par de partidores (300 nM) y 40 ng de cADN. El protocolo de la reacción comenzó con un paso de denaturación por 10 min a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 60 °C por 15 s y 72 °C por 20 s. El ensayo de SYBR Green también incluye la medición de la curva de disociación al final de los ciclos realizados, ésta se realiza mediante una medición continua de fluorescencia de 70 a 95 °C. Se realizó los controles sin templado también en duplicado por cada mezcla de par de partidores. Los valores de la cuantificación de los ciclos basal y umbral (Cq) se determinaron automáticamente para todas las reacciones utilizando el programa MxPro (Stratagene, CA, USA). Los resultados fueron normalizados a los obtenidos en paralelo con los genes *Rpl13a*, *Hprt* y *βactin*, utilizados como genes de referencia.

6.6. *Secuenciación*—El ARN total de tres muestras de células de NHR (3 muestras), fue utilizado para evaluar la integridad del ARN en el equipo Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Los valores de RIN (Número de integridad del ARN) obtenidos fueron al menos mayores a 7.5 para las NHR, como se muestra en la tabla 1. El ARN fue procesado utilizando el *kit Illumina mRNA TruSeq Stranded* para generar librerías de 280 pb de tamaño en *pair-end*. Estas librerías fueron secuenciadas utilizando el equipo de Illumina, HiSeq 2000. Se alineó las lecturas crudas (con una profundidad de 60M 2x 80 - 60 millones de lecturas promedio, realizadas en *pair end*, con un tamaño aproximado de 80 pb - como se muestra en la Tabla 1) a las construcciones del genoma de referencia de rata, Rnor6, utilizando el paquete de programas de la plataforma de R, *Bioconductor* (Tabla 2) (v3.1; Gentleman, 2004; Huber, 2015). La expresión

diferencial para genes candidatos se evaluó estadísticamente con DESeq (v1.20; Anders y Huber, 2010), analizando los datos con dos estrategias diferentes como valores umbral de corte, considerando un valor de veces de cambio (VC) mayor o menor al 25% de variación por gen, o considerando valores nominales de *p-value* (< 0.05). Finalmente se evaluó la correlación entre las muestras (Tabla 3), en donde todos los valores se encontraban sobre 0.93, que es lo adecuado para experimentos de secuenciación masiva de transcriptoma según las directrices de ENCODE (The Encyclopedia of DNA Elements Consortium. 2011).

Tabla 1. Valores característicos de librerías y estándares de calidad.

Identificador	Muestra ID	Lecturas totales (Mb)	GC (%)	AT (%)	RIN	Q30 (%)
C1	Rn_C4h-25-3	56.79	50.08	49.92	8.2	89.39
C2	Rn_C4h-23-4	53.24	50.21	49.78	7.9	89.39
C3	Rn_C4h-22-12	189.71	50.50	49.50	10.0	92.36
W1	Rn_W4h-25-3	54.35	50.12	49.88	7.8	89.32
W2	Rn_W4h-23-4	55.58	50.31	49.68	7.2	89.12
W3	Rn_W4h-22-12	194.05	50.44	49.55	10.0	92.56

Tabla 2. Valores estadísticos del alineamiento de secuencias usando el paquete *Bioconductor*.

Identificador	Muestra ID	Input R1 (lecturas)	Mapeadas (lecturas)	Mapeadas (%)	Input R2 (lecturas)	Mapeadas (lecturas)	Mapeadas (%)	Tasa Mapeo (%)
C1	Rn_C4h-25-3	28,396,511	24,073,712	84.78	28,396,511	24,001,972	84.52	84.65
C2	Rn_C4h-23-4	26,617,832	23,496,274	88.27	26,617,832	23,409,699	87.95	88.11
C3	Rn_C4h-22-12	93,919,684	80,368,624	85.57	93,919,684	79,539,537	84.69	85.14
W1	Rn_W4h-25-3	27,174,572	23,968,025	88.20	27,174,572	23,888,677	87.91	88.05
W2	Rn_W4h-23-4	27,792,483	23,953,882	86.19	27,792,483	23,834,804	85.76	85.97
W3	Rn_W4h-22-12	125,578,182	87,683,880	69.82	125,578,182	86,543,807	68.92	69.37

Tabla 3. Muestras de rata que sobrepasan los umbrales de calidad por correlación de Pearson.

Muestra	C1	C2	C3	W1	W2	W3
C1	1.00					
C2	0.97	1.00				
C3	0.97	0.95	1.00			
W1	1.00	0.96	0.97	1.00		
W2	0.95	0.93	0.98	0.95	1.00	
W3	0.98	0.95	0.99	0.98	0.95	1.00

6.7. *Análisis de categorías ontológicas*—Los genes sobre-regulados de rata (según ambas estrategias, $VC > 1.25$ o $p\text{-value} < 0.05$), fueron analizados utilizando el programa *Ontologizer* (Grossmann et al., 2007) con el fin de encontrar ontologías (GO) estadísticamente enriquecidas en la data biológica. El enriquecimiento se determinó en referencia a todos los IDs de genes de rata que fueron anotados de acuerdo a categorías ontológicas, pudiendo ser procesos biológicos (BP), componentes celulares (CC) o funciones moleculares (MF). Los $p\text{-values}$ de dichas categorías fueron establecidos posterior a la realización de un test hipergeométrico por la corrección de Benjamini y Hochberg de tasa de falsos positivos (Benjamini y Hochberg. 1995). Se estableció un valor de corte de $p\text{-value} < 10E10^{-5}$ con la finalidad de identificar categorías enriquecidas significativamente. La base de datos de STRING (v10.0; Jensen et al., 2009) fue utilizada para la construcción de una red regulatoria de transcritos expresados diferencialmente. Se visualizó estas redes mediante el programa *Cytoscape* (v3.3; Shannon et al., 2003). El programa *Cluster* (v3.0; De Hoon et al., 2004) fue usado para establecer una agrupación jerárquica de los genes sobre regulados presentes en las categorías ontológicas. La matriz de expresión fue visualizada con un dendrograma utilizando Java TreeView (v3.0; Noebels, 2011).

6.8. *Red de asociaciones funcionales de proteínas (FPAN)*—Para analizar las interacciones conocidas entre los genes expresados diferencialmente, utilizamos las interacciones funcionales de alta confianza de la base de datos STRING 10.0 (Sigla en inglés de, *Search Tool for Retrieval of Interacting Genes/Proteins*; <http://string-db.org/>) (Szklarczyk et al., 2011), la cual contiene interacciones curadas de diferentes fuentes de evidencia (Ejemplo: Contextos genómicos, co-expresión, literatura revisada, entre otros). Sólo se mantuvo las interacciones con la mayor confiabilidad (Interacciones con un puntaje combinado < 0.9 , provisto por STRING). La red FPAN finalmente utilizada consta de 9443 nodos (genes de rata) y 309728 ejes no redundantes (interacciones). Se visualizó todas las redes y sub redes en el programa *Cytoscape*.

6.9. *Búsqueda de módulos*—Todos los genes con sus valores de *p-value* obtenidos con DESeq fueron introducidos a la red FPAN como un atributo de coma flotante (representación decimal aproximada de un valor racional con muchos dígitos). Se consideró un valor de corte para veces de cambio mayores a 1.25 (25%) para la inclusión ($n = 2892$ genes). La búsqueda de módulos fue llevada a cabo con el *plugin* de *Cytoscape JActiveModules* (Ideker et al., 2002) con un umbral de solapamiento de genes de 20% siguiendo el método reportado previamente (Baranzini et al., 2009; Pérez-Palma et al., 2014). De forma explicativa, el programa busca sub-redes conectadas altamente significativas o módulos enriquecidos con información de expresión (*p-value*). Partiendo desde un nodo aleatorio (por el procedimiento de Monte Carlo) se evaluó el crecimiento de los módulos en contraste con una distribución de genes que sólo correspondiera a ruido de fondo (*background*), la cual fue creada por el programa *excel* (*Microsoft Excel*, 2016) utilizando 10000 opciones aleatorias internas, obteniendo un puntaje específico de desviación estándar (puntaje *S*). Los módulos con $S > 3$ (3 desviaciones estándar sobre el promedio de puntajes aleatorios) y con un número de genes entre 10 a 50, fueron considerados como significativos (Baranzini et al., 2009). Para obtener un puntaje *S* promedio y desviación estándar (DE) para cada módulo resultante, la búsqueda fue realizada 10 veces. Finalmente, el mismo procedimiento fue realizado con *p-values* permutados sobre todos los genes presentes en la red FPAN (Análisis permutado). Los análisis de diferencias estadísticas entre la data permutada y la real (Incubación con Wnt3a) se realizó con *test t-student*. A modo esquemático se presenta un diagrama de flujo, detallando los pasos a seguir de la metodología y algunas especificaciones de cada uno de sus pasos (Figura 3).

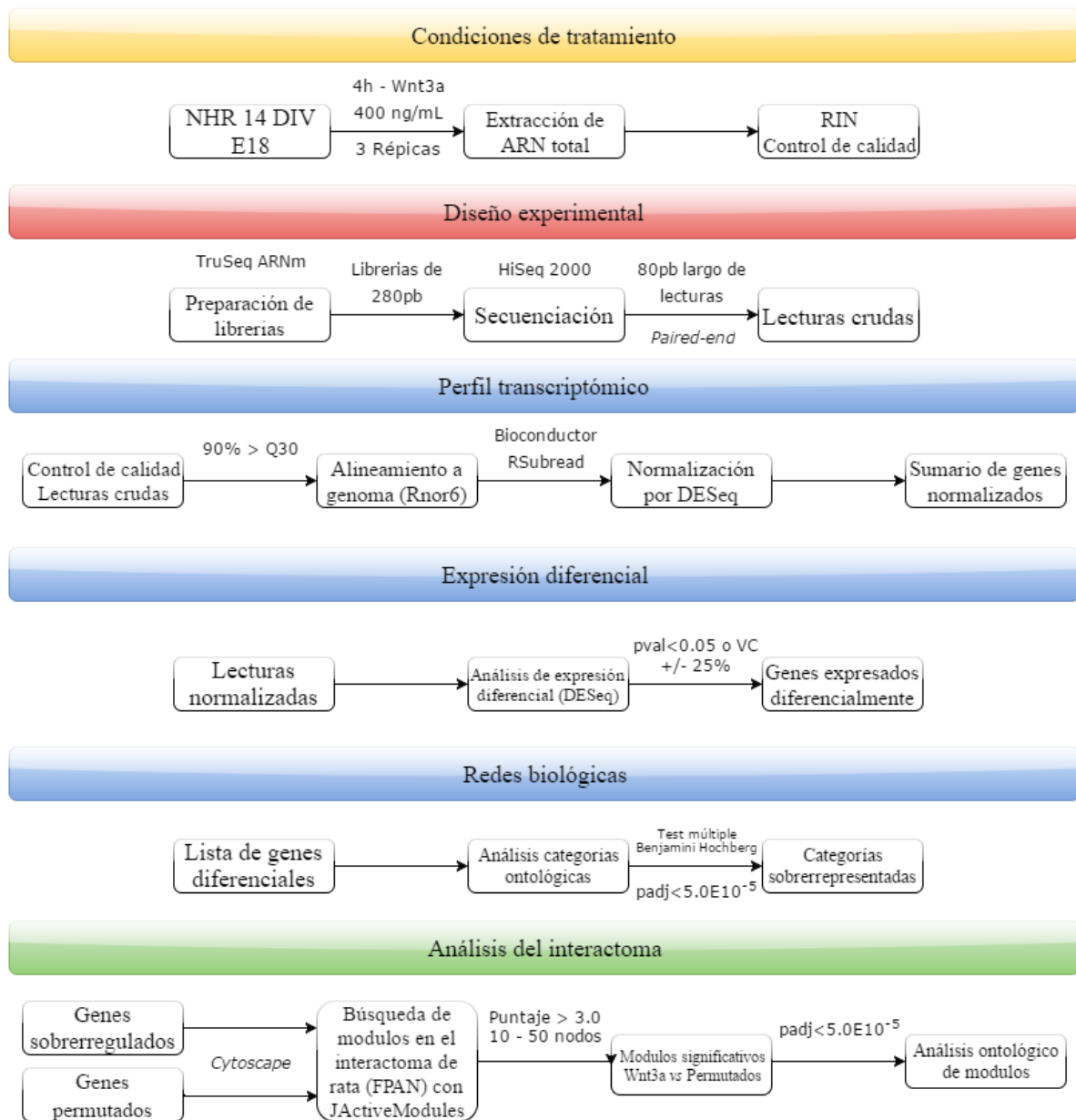


Figura 3. Diagrama de flujo de actividades desarrolladas. En la imagen se detallan los pasos seguidos para el análisis de las muestras seleccionadas. Se indican parámetros clave en el desarrollo de cada etapa principalmente a través de la secuenciación, el alineamiento al transcriptoma de referencia, normalización de datos y análisis de ontologías y redes en el interactoma.

7. RESULTADOS

7.1. *Wnt3a promueve la estabilización de β -catenina y la expresión de genes canónicos Wnt*—La proteína Wnt3a funcional pura, obtenida desde células L de ratón, es capaz de inducir la acumulación de la proteína β -catenina en el cultivo primario de neuronas de hipocampo de embrión de rata E18 de 14 días *in vitro*. Para analizar la actividad funcional de la proteína Wnt3a en las células, llevamos a cabo ensayos de Western Blot para observar la estabilización de la proteína β -catenina en extractos totales de proteína, y la técnica de qPCR en tiempo real para genes descritos que se regulan por esta vía de señalización. La determinación cuantitativa de los niveles de mRNA en ambos modelos mostró que Wnt3a induce rápidamente (4 h) un incremento de los genes *Ccnd1* y *Nlgn3* (Ciclina D1 y Neuroligina 3, respectivamente. Ambos blancos transcripcionales de la vía de señalización Wnt/ β -catenina; N=3; 2.2 y 2.05 veces de cambio) (Figura 4a y b).

7.2. *Respuesta a tratamientos con Wnt3a en el programa transcripcional global*—Luego de los controles de calidad, se seleccionó muestras para llevar a cabo ensayos de expresión diferencial, considerando aquellos que mostraran una activación de la vía de señalización Wnt canónica. Se obtuvo valores de buena calidad para las librerías generadas y los experimentos de RNASeq de las muestras de rata (Q30 > 89%, Tabla 1). A continuación, se normalizó la data para poder trabajar con ésta, considerando el número de lecturas de cada librería de forma independiente (Figura 5a, b), los conteos totales entre las librerías (Figura 5c,d) y, la varianza entre los controles y tratamientos, obteniendo una distribución final de *p-values* para los datos procesados de forma conjunta (Figuras 5e). Posteriormente se evaluó el comportamiento de todo el transcriptoma entre cada muestra para rata, en donde al agrupar por dendogramas muestran una correlación mayor entre cada control con su tratamiento respectivo en vez de hacerlo con sus réplicas, independiente de este efecto, es posible evidenciar un comportamiento normal que se condice con la correlación entre todas las muestras para la especie (Figura 6a).

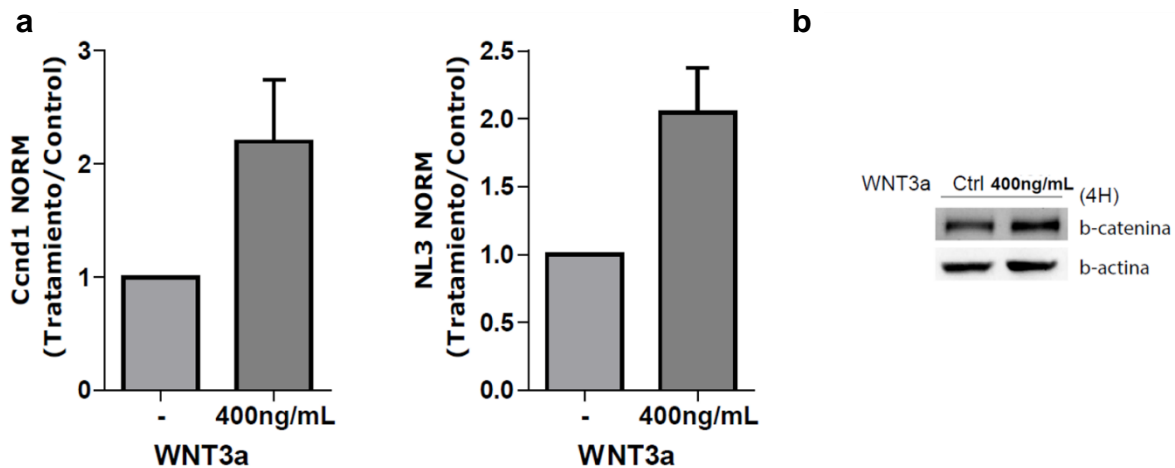


Figura 4. Expresión de genes blanco de la vía Wnt y estabilización de β -catenina en NHR. (a) El ARN total de las células incubadas con 400 ng/mL de Wnt3a, por 4-h, fue extraído y usado para la realización de experimentos de qPCR en tiempo real para determinar los niveles de mRNA de Ccnd1, Nlgn3 (blancos transcripcionales reportados de la vía de señalización) y Rpl13a, Hrpt y β -actin (como controles internos de carga, pues se encuentran expresados de manera constitutiva). Se llevó a cabo un protocolo de corrida de 40 ciclos para la evaluación. Cada figura corresponde al menos a 3 experimentos independientes. (b) Imagen representativa de los niveles totales de la proteína β -catenina en las mismas muestras de NHR, examinado a través de análisis de Western Blot y utilizando 30 μ g totales de extracto proteico. La proteína β -actina, miembro de las proteínas estructurales del citoesqueleto, fue utilizada como control interno de carga.

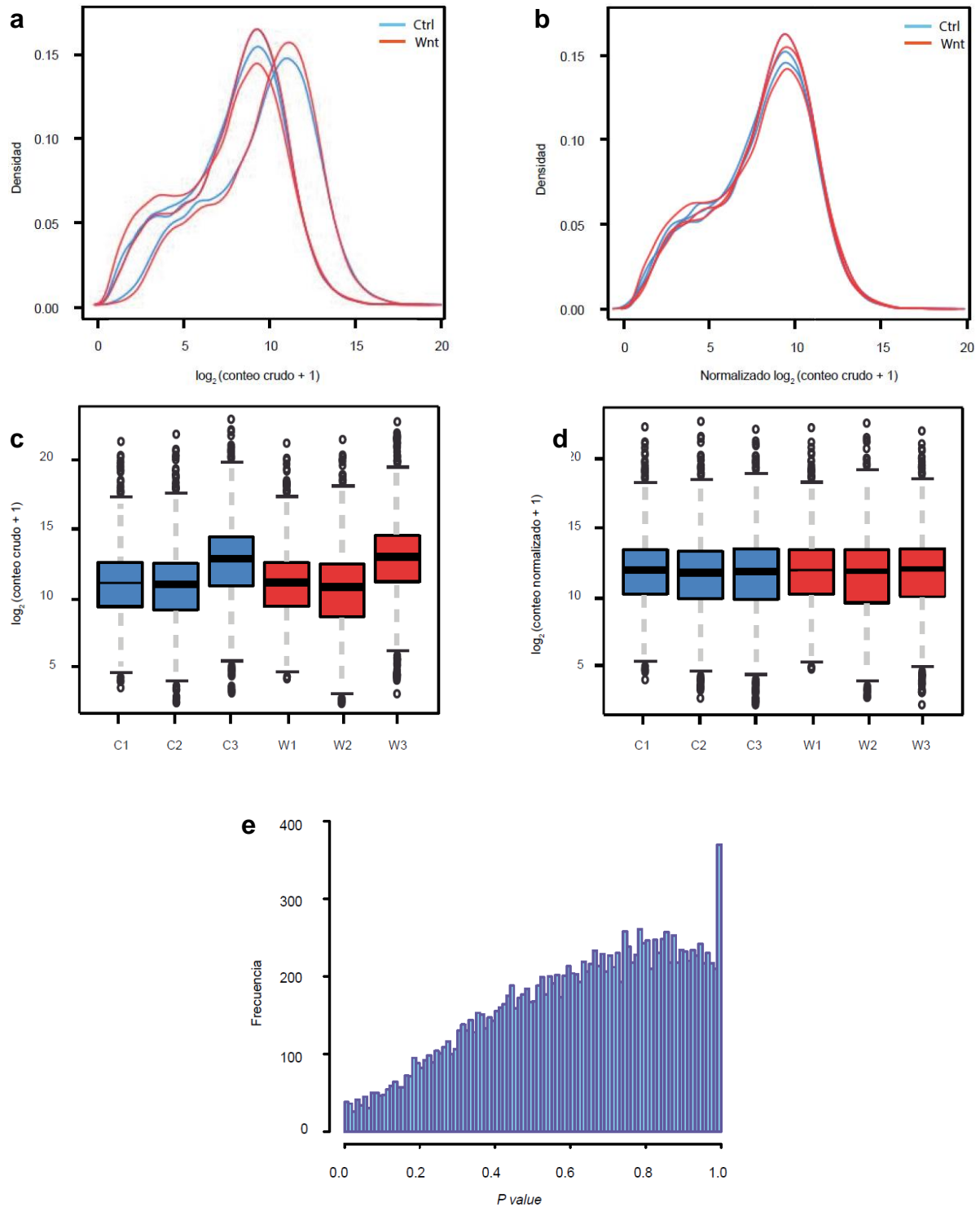


Figura 5. Análisis de normalización de lecturas totales para muestra de RNASeq. Densidad del conteo de lecturas mostrando la distribución a través de cada muestra antes (A) y después de la normalización (B). Los ejes verticales muestran las densidades del conteo de lecturas para cada muestra y el eje horizontal muestras el $\log_2 + 1$ del conteo de lecturas. En la sección media,

distribución de lecturas totales (representadas como cajas), antes (C) y después de la normalización (D). El eje vertical muestra el $\log_2 + 1$ del conteo de lecturas. Cada caja muestra la distribución de la varianza para cada muestra. En la sección inferior, histograma de distribución de *p-value* mostrando pruebas de significancia para los valores de expresión diferencial luego del procedimiento de normalización. Los ejes verticales muestran la frecuencia de *p-values* en el grupo de genes con expresión diferencial (E).

Se estableció un umbral de expresión de genes con un valor de VC mayor o menor a un 25% por gen, con el fin de analizar módulos de interacción de un gran número de genes que variaron y pudiesen representar en conjunto algún término ontológico, o un valor nominal de *p-value* < 0.05, buscando categorías enriquecidas por genes expresados diferencialmente de manera significativa (Figura 6c). Se obtuvo un total de 4304 genes por VC, mientras que para la estrategia con umbral por *p-value*, se obtuvo 170 genes expresados diferencialmente y, de manera significativa con valor p nominal para las muestras (Figura 6c). Luego, agrupamos los genes en aquellos que se encuentran aumentados o disminuidos según su VC, como se indica en la Figura 6d. Los cambios en los genes expresados diferencialmente normalizados por log₂ de las veces de cambio se representaron por un *heatmap* (Figura 6b), en donde se muestra una tendencia de sobre regulación en respuesta al tratamiento con Wnt3a (en rojo) con un 88.0% (149 genes) de los 170 genes. Los genes TOP sobre expresados en rata presentan distintos candidatos importantes en las muestras (Tabla 4), siendo el más importante Fam84a. Entre los TOP 20 se encontró 11 genes conocidos por ser regulados por la vía Wnt, incluyendo Notum, Lef1, Axin2 y Cxcl3. Los resultados anteriores indican que luego de un tratamiento transiente con Wnt3a, podemos identificar mARNs nacientes derivados de la actividad de la vía Wnt/ β -catenina en el programa transcripcional global de neuronas hipocámpales de rata. A continuación, se enfocó nuestros análisis posteriores solamente en los genes diferencialmente expresados de rata para su posterior categorización. Proseguimos realizando una caracterización funcional de los genes expresados diferencialmente (Figura 7), este análisis reveló que las principales categorías proteicas representadas se agrupan en funciones moleculares asociadas con factores de transcripción (18.1%), proteínas con capacidad de unirse a los ácidos nucleicos (14.8%) y moléculas asociadas con señalización (8.7%) posterior a la estimulación con Wnt3a.

Posteriormente, se observó el efecto transcripcional directo de la vía de señalización Wnt/ β -catenina en las NHR, con el fin de evitar el sesgo asociado con

la posible activación de algunas vías de señalización secundarias que no se encontrasen relacionadas. Se intersectó los 170 genes nominales diferencialmente expresados con la vía del reactoma “Señalización Wnt independiente de β -catenina”, incluyendo además 149 genes pertenecientes a las vías no canónicas PCP y/o Ca^{2+} . Sólo los genes Lef1, Tcf7 y Prkg2 fueron encontrados en ambos grupos de genes (Figura 8). Con lo anterior, concluimos que Wnt3a no promueve la expresión de componentes no canónicos.

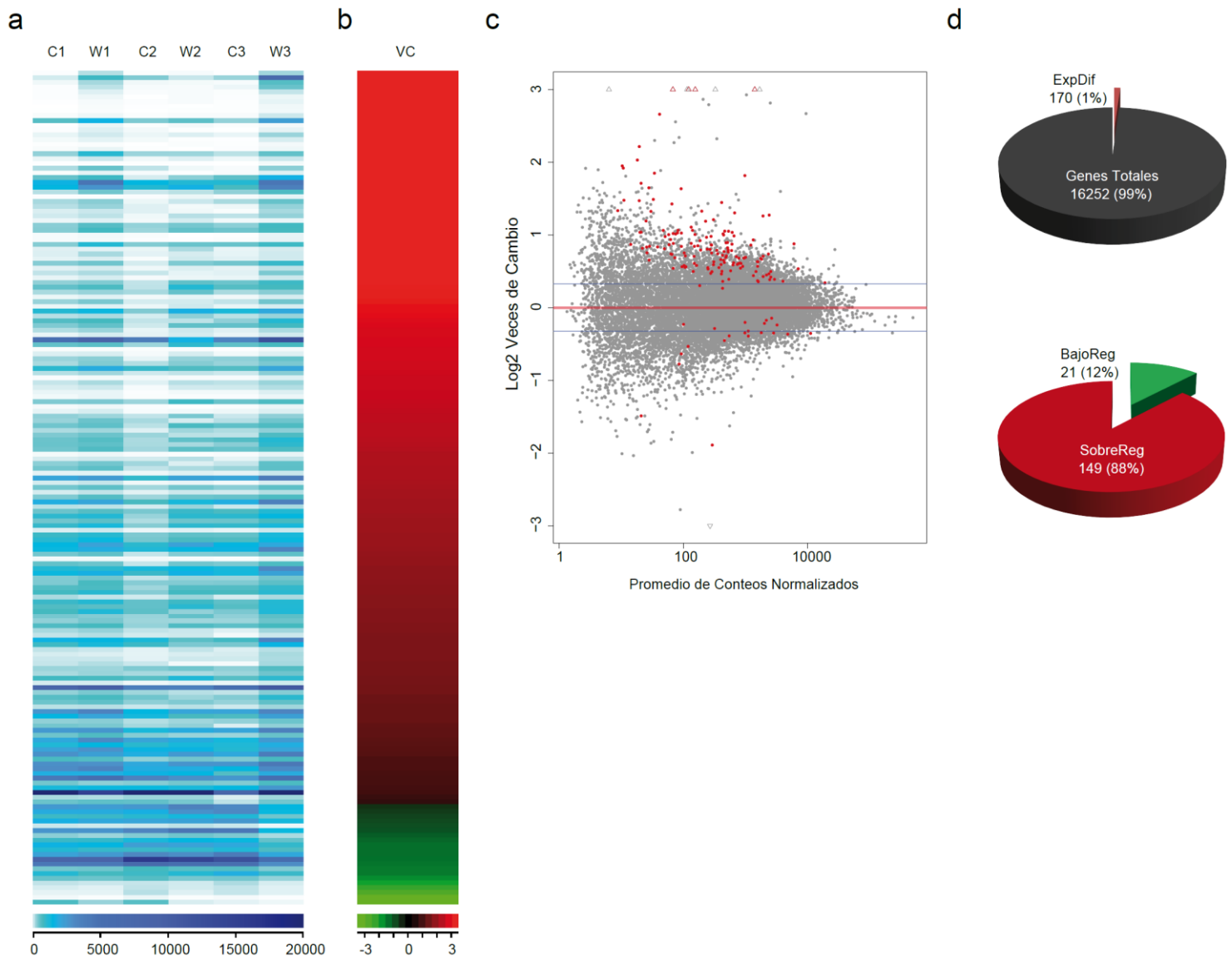


Figura 6. Análisis del transcriptoma, expresión diferencial y significancia de genes de rata en presencia de Wnt3a. (a) Se muestra el comportamiento para todos los genes del análisis de rata según el total de lecturas normalizadas por muestra. (b) Análisis de 170 genes de rata, los cuales se encuentran considerados por tener una regulación diferencial al sobrepasar el umbral de significancia bajo 0.05 *p-value*. Valores en veces de cambio (VC). (c) Luego del tratamiento con Wnt3a, se observó los genes que aumentaban o disminuían su expresión. En el Plot diferencial (PlotMA hecho con DESeq) se observa una representación visual de los valores de expresión en Log₂ de las veces de cambio de los genes (eje Y), y los conteos de lecturas normalizados por gen (eje X), entre las condiciones control y tratamiento. Se obtuvo un total de 170 genes expresados diferencialmente para la rata, en donde estos corresponden a los puntos rojos, luego de haber pasado por los controles de calidad y la normalización por varianza, obteniéndose valores con un *p*-

value < 0.05. Los puntos negros corresponden a genes que no pasaron los controles de calidad (valor de significancia mayor al nominal). (d) A continuación se muestra el desglose de los genes de ambas listas para los grupos que aumentan o disminuyen su expresión, de los 170 genes que varían en total (1.0% de los genes pezquizados que al menos tuvieron 1 lectura), con 149 y 21 genes, respectivamente. En rojo, se observa el porcentaje del total de genes del Plot diferencial sobre-representados, mientras que el color negro, muestra los genes bajo el umbral de significancia. La representación de los valores totales de genes que aumentan o disminuyen se observa en los colores rojo o verde, respectivamente.

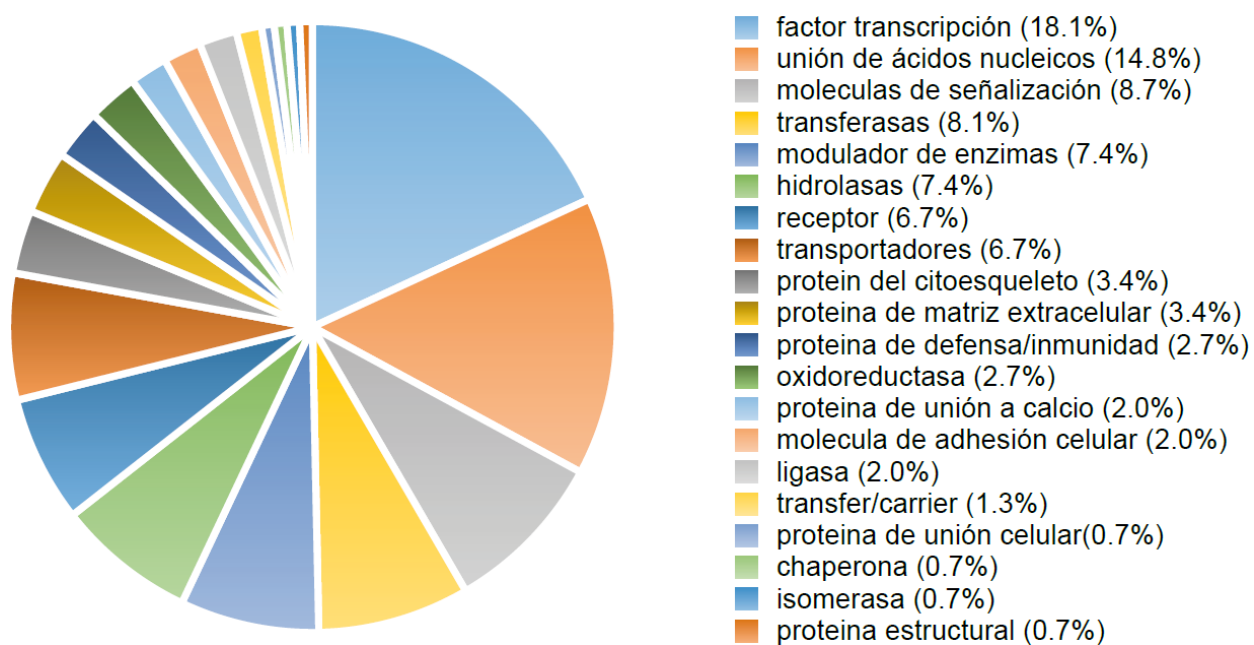


Figura 7. Funciones moleculares representadas de genes expresados diferencialmente.

Análisis de los 170 genes de rata, los cuales se encuentran categorizados en funciones moleculares, siendo la mayoría representados por factores de transcripción.

Tabla 4. Top 20 genes sobre-regulados por Wnt3a nominalmente significativos en neuronas hipocampales de rata.

Símbolo ID	VC	<i>p-value</i>	Vía Wnt	Referencias
Fam84a	2.4	2.2×10^{-6}	-	-
Notum	14.1	1.5×10^{-5}	Gen Wnt	[Nagendran, 2015; Kakugawa, 2015]
Lef1	2.1	1.7×10^{-5}	Gen Wnt	[Filali, 2002]
Axin2	3.5	1.2×10^{-4}	Gen Wnt	[Jho, 2002]
Prkg2	2.7	1.4×10^{-4}	Funcional	[Kawasaki, 2008]
Cxcl3	4.6	5.2×10^{-4}	Gen Wnt	[Segditsas, 2008]
Ahr	2.1	1.0×10^{-3}	Gen Wnt	[Gerbal, 2014]
Stk32a	1.8	1.3×10^{-3}	-	-
Itga9	2.0	1.7×10^{-3}	-	-
Tnfresf19	2.4	1.8×10^{-3}	Gen Wnt	[Buttitta, 2003]
Tmem72	1.7	2.0×10^{-3}	-	-
Fras1	1.9	2.2×10^{-3}	-	-
Fam167a	1.8	2.2×10^{-3}	-	-
Gata2	2.8	2.3×10^{-3}	Funcional	[Mimoto, 2015]
Id2	1.3	3.0×10^{-3}	Gen Wnt	[Rockman, 2001]
Msx2	2.1	3.9×10^{-3}	Gen Wnt	[Zhai, 2011]
Sp5	10.3	4.2×10^{-3}	Gen Wnt	[Fujimura, 2007]
Cd83	2.1	4.4×10^{-3}	-	-
Cgln1	1.5	4.9×10^{-3}	-	-
Hunk	1.5	5.3×10^{-3}	Gen Wnt	[Reed, 2015]

Funcional: Proteínas conocidas por modular la actividad transcripcional de la vía Wnt. VC: veces de cambio. Gen Wnt: Blanco transcripcional de la vía Wnt.

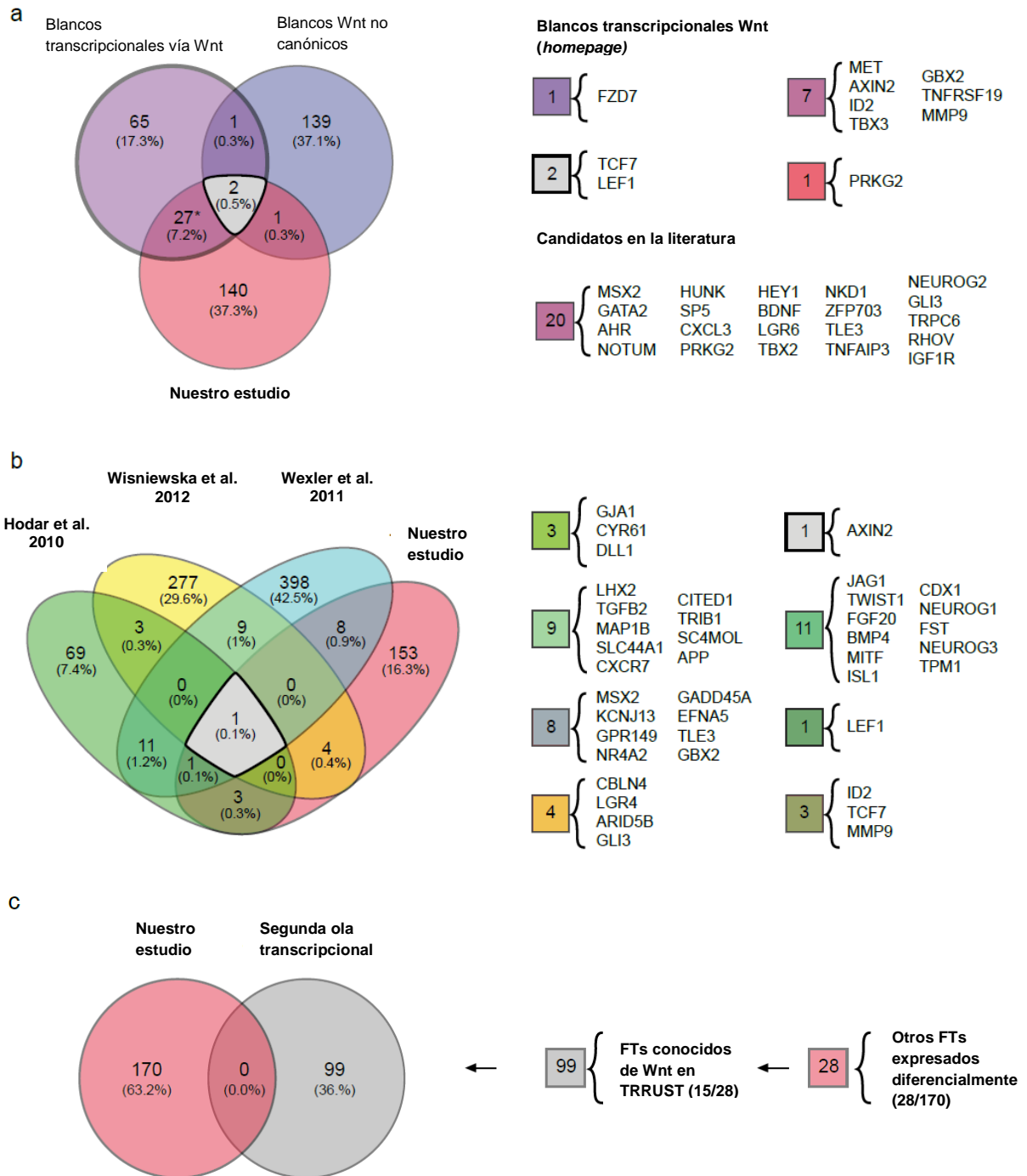


Figura 8. Sobreapamiento de genes modulados por Wnt/ β -catenina de manera temprana. (a)

Diagrama de Venn mostrando el sobreapamiento de nuestros genes nominales (“Nuestro estudio”, círculo rojo, $n = 170$) y los genes modulados curados (revisados y confirmados por trabajos previos) de *Wnt Homepage* (círculo violeta, $n = 75$), también de componentes no canónicos de la vía de señalización Wnt, extraídos de la base de datos del reactoma. (b) Diagrama de Venn mostrando el sobreapamiento entre i) Genes reportados como modulados por la vía Wnt/ β -catenina descritos por

Hodar et al., 2010 (Círculo verde, n = 89); ii) Red de genes transcripcionalmente regulados por Wnt1 en progenitores neuronales reportados por Wexler et al., 2011 (Círculo amarillo, n = 294); iii) Genes con sitios putativos TCF/LEF1 reportados por Wisniewska et al., 2012 (Círculo celeste, n = 428); y iv) Nuestros genes expresados diferencialmente de forma significativa (círculo rojo, n = 170). Para cada comparación, los detalles se desglosan en los cuadros según similitud de colores. (c) Diagrama de Venn describiendo el solapamiento entre nuestros 170 genes nominales (“Nuestro estudio”, círculo rojo) y la “segunda ola transcripcional”, definida por los genes conocidos que pudieran activarse de forma indirecta a través de los 28 factores de transcripción iniciales, expresados nominalmente en nuestro estudio (círculo gris, n = 99). Los genes de esta última categoría se obtuvieron de una base de datos curada de candidatos transcripcionales humanos TRRUST (<http://www.grnpedia.org/trrust/>) para 15 (AHR, ARX, DACH1, FOXO1, FOXO3, GATA2, GBX2, ID2, ID4, MSX2, NFAT5, NR4A2, TBX2, TBX3 and TFAP2C) de 28 factores de transcripción, de los cuales había información disponible.

7.3. *Sobre-representación de categorías ontológicas y sus componentes en el interactoma de rata*—Luego de aplicar los umbrales definidos, continuamos nuestro análisis solamente con los genes obtenidos del cultivo primario hipocampal de rata en búsqueda que categorías ontológicas representadas usando *Ontologizer*. A continuación, encontramos un enriquecimiento en categorías de procesos biológicos asociadas al desarrollo cerebral y homeostasis, en lo que se incluyen genes asociados con proliferación de células precursoras neuronales (GO:0061351; *p-value* ajustado = 1.6×10^{-10}), desarrollo del prosencéfalo (GO:0030900; *p-value* ajustado = 2.2×10^{-9}) y diferenciación de células madre (GO:0048863; *p-value* ajustado = 2.3×10^{-9}). De manera similar, para la categoría de función molecular, se encontró representada la actividad de unión a ADN por secuencia específica (GO:0043565; *p-value* ajustado = 4.1×10^{-6}). Todos estos genes y su relación funcional se muestran en la Figura 9 y Tabla 5. Se observa también, un alto grado de solapamiento entre las categorías anteriores con 37 genes (7 de los cuales se encuentran entre los TOP 20 sobre regulados; Figura 9, nodos hexagonales), responsables del enriquecimiento dado por 89 asociaciones ontológicas (Figura 9, ejes de colores). En conjunto, se detectó 11 interacciones de alta confiabilidad, conectando 21 de los 170 genes usando la red FPN extraída de la base de datos de STRING (Ver materiales y métodos).

Del mismo modo anterior, se evaluó si existía un enriquecimiento de módulos con la lista de genes sobre regulados obtenida de la rata en el interactoma, esperando encontrar redes representadas por el tratamiento con Wnt3a, las cuales entregan información de las interacciones proteicas que existen en dicho contexto. Así mismo, fue posible encontrar una mayor cantidad de éstos (Figura 10a), los cuales se representan de forma significativa con el tratamiento por Wnt3a contra una lista de genes permutada del transcriptoma de la rata, llegando a ser aproximadamente el doble de módulos.

Tabla 5. Procesos ontológicos sobre representados. Se muestran en la tabla las categorías representadas (las cuales representan un valor de p-ajustado por corrección del *test* múltiple de Benjamini-Hochberg menores a 1.0×10^{-6}) sobre los umbrales de significancia.

Categoría	GO ID	GO Nombre	GIP	GIS	p-ajustado (BH)
BP	GO:0061351	Proliferación precursores neurales	122	14	1.6×10^{-10}
	GO:0030900	Desarrollo prosencéfalo	266	18	2.2×10^{-09}
	GO:0048863	Diferenciación células madre	267	18	2.3×10^{-09}
	GO:0007420	Desarrollo cerebral	418	22	1.0×10^{-06}
	GO:0048732	Desarrollo de glándula	289	18	1.6×10^{-06}
	GO:0048864	Desarrollo células madre	225	16	1.6×10^{-06}
	GO:0021872	Generación de neuronas en prosencéfalo	58	9	3.3×10^{-06}
	GO:0021953	Diferenciación neural en sistema nervioso central	138	12	7.0×10^{-06}
	GO:0045165	Compromiso del destino celular	173	13	9.6×10^{-06}
CC	na	na	na	na	na
MF	GO:0043565	Unión a secuencia específica del ADN	452	22	4.1×10^{-06}

BP: Procesos biológicos; CC: componentes celulares; MF: función molecular; GO ID: termino ontológico del gen ID; GIP: Genes en la población; GIS: Genes en estudio; BH: Benjamini-Hochberg; prueba de corrección corregida.

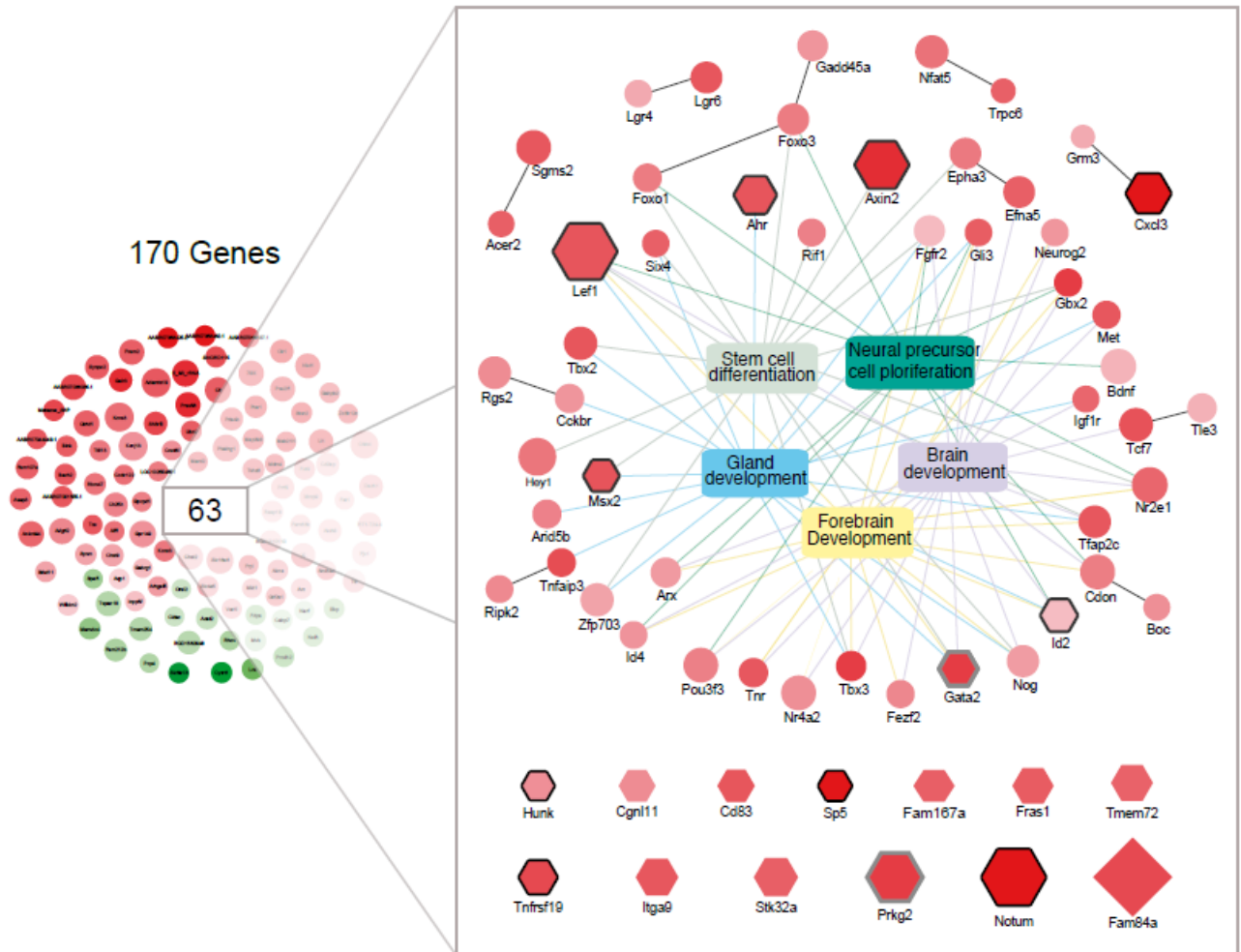


Figura 9. Redes biológicas sobre-representadas en respuesta a Wnt3a. El color de los nodos representa las veces de cambio observadas, siendo verde una disminución en la expresión y rojo un aumento. (verde = $VC < 1$; blanco = $VC = 1$; rojo = $VC > 1$). El tamaño del nodo es proporcional al valor de significancia de dicho gen asignado por DESeq. Se sobre representan 5 categorías ontológicas y sus respectivas asociaciones. Las interacciones funcionales directas se extrajeron desde la base de datos de STRING, mostradas como ejes de color negro. Los nodos hexagonales representan los genes TOP 25 expresados diferencialmente, mientras que el nodo con forma de diamante representa el TOP 1 (FAM68a). Los bordes de nodos negros y grises representan los TOP 20 genes modulados por Wnt o asociados a la vía con evidencias funcionales, respectivamente.

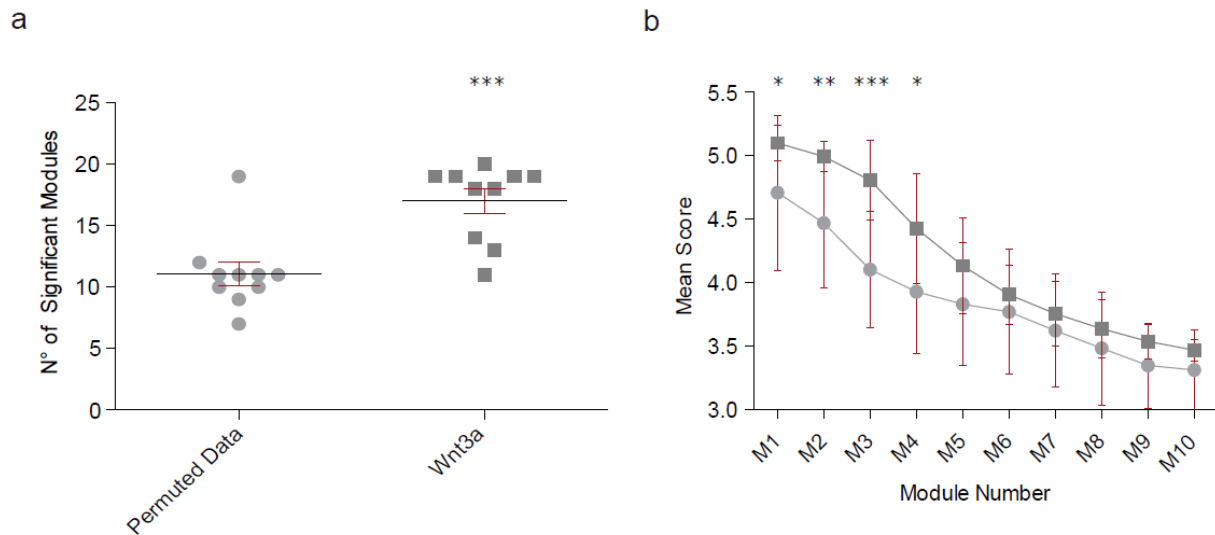


Figura 10. Módulos enriquecidos con el tratamiento con Wnt3a. En A se observa el enriquecimiento de módulos dentro del interactoma que se representan con esta lista de genes sobre expresados por el tratamiento con Wnt3a contra una data permutada con valores azarosos en el transcriptoma de rata. P-value < 0.0001. En B se representan los módulos TOP en promedio de 5 réplicas experimentales para la data del tratamiento con Wnt3a contra la data permutada. Se observa que los puntajes de los módulos obtenidos con el tratamiento con Wnt3a son significativos con un *p-value* * < 0.05, ** < 0.001, *** < 0.00001.

Mientras que los análisis de expresión diferencial permiten la identificación de genes alterados en tejidos específicos, evaluando gen por gen, la aproximación de búsqueda de módulos permite además integrar relaciones funcionales entre genes/proteínas (Parikshak et al., 2015). Sin embargo, dado que al converger o agregarse señales de expresión adicionales en un conjunto de genes, puede convertirse en información significativa en un contexto de redes, proseguimos analizando los módulos obtenidos, con lo que se evaluó si al agrupar estos genes, su análisis permite la representación de algún proceso en común. El puntaje promedio de los cuatro primeros módulos obtenidos del tratamiento con Wnt3a era significativamente mayor en comparación con los resultados permutados (M1-M4; Figura 10b). El puntaje de M4 se encontraba por debajo del puntaje más alto generado aleatoriamente y por ello no se consideró para posteriores análisis. En conjunto estos resultados muestran que el número y estructura de los módulos que permanecieron consistentes entre las 10 iteraciones realizadas, no son generados de forma azarosa, apoyando la idea de que las sub-redes de los módulos M1, M2 y M3 tendrían un sentido biológico. Los componentes de estos módulos y sus interacciones se encuentran en la Figura 11. Los análisis ontológicos de los mismos, revelaron que M1 se encuentra altamente enriquecido en genes pertenecientes a la categorías de procesos metabólicos de glicerolípidos (Tabla 6; GO:0046486; *p-value* ajustado = 4.5×10^{-19}) y actividad lipasa (GO:0016298; *p-value* ajustado = 5.2×10^{-9}); M2 se encuentra principalmente asociado con procesos de aprendizaje y memoria (GO:0007611; *p-value* ajustado = 4.0×10^{-5}) con genes que participan en adhesión molecular de la célula (GO:0050839; *p-value* ajustado = 1.1×10^{-6}); M3 se encuentra sobre representado con genes que pertenecen a procesos de secreción de neurotransmisores (GO:0007269; *p-value* ajustado = 5.3×10^{-12}) y actividad de unión a syntaxina-1 (GO:0017075; *p-value* ajustado = 1.2×10^{-12}).

Tabla 6. Categorías TOP 3 sobre representadas en las sub-redes post inducción con Wnt3a.

Módulo	Categoría	GO ID	GO Nombre	GIP	GIS	p-ajustado (BH)
M1						
	BP	GO:0046486	Procesos metabólicos de glicerolípidos	193	18	4.5x10 ⁻¹⁹
		GO:0006644	Procesos metabólicos de fosfolípidos	166	17	1.1x10 ⁻¹⁸
		GO:0006650	Procesos metabólicos de glicerofosfolípidos	134	16	1.2x10 ⁻¹⁸
	MF	GO:0016298	Actividad lipasa	59	8	5.2x10 ⁻⁰⁹
		GO:0016788	Actividad hidrolasa, actuando en enlaces ester	430	14	1.2x10 ⁻⁰⁸
		GO:0004620	Actividad fosfolipasa	47	7	1.7x10 ⁻⁰⁸
M2						
	BP	GO:0007611	Aprendizaje y memoria	181	7	4.0x10 ⁻⁰⁵
		GO:0050890	Procesos cognitivos	200	7	4.4x10 ⁻⁰⁵
	CC	GO:0043256	Complejo laminina	8	4	2.0x10 ⁻⁰⁷
		GO:0005610	Complejo laminina-5	4	3	2.9x10 ⁻⁰⁶
		GO:0005605	Laminina basal	18	4	2.9x10 ⁻⁰⁶
	MF	GO:0050839	Moléculas de unión en adhesión celular	131	7	1.1x10 ⁻⁰⁶
		GO:0001948	Unión de glicoproteínas	74	5	1.7x10 ⁻⁰⁵
		GO:0005178	Unión de integrinas	76	5	1.7x10 ⁻⁰⁵
M3						
	BP	GO:0007269	Liberación de neurotransmisores	82	10	5.3x10 ⁻¹²
		GO:0006887	Exocitosis	176	12	5.3x10 ⁻¹²
		GO:0016079	Exocitosis de vesículas sinápticas	37	8	1.2x10 ⁻¹¹
	CC	GO:0044456	Parte de la sinápsis	373	14	2.6x10 ⁻¹¹
		GO:0043679	Terminal axonal	131	10	7.7x10 ⁻¹¹
		GO:0044306	Terminal de proyección neuronal	139	10	9.4x10 ⁻¹¹
	MF	GO:0017075	Unión sintaxina-1	16	7	1.2x10 ⁻¹²
		GO:0000149	Unión a SNARE	69	8	8.0x10 ⁻¹⁰
		GO:0019905	Unión sintaxina	46	7	1.7x10 ⁻⁰⁹

BP: Procesos biológicos; CC: componentes celulares; MF: función molecular; GO ID: termino ontológico del gen ID; GIP: Genes en la población; GIS: Genes en estudio; BH: Benjamini-Hochberg; prueba de corrección corregida.

8. DISCUSIÓN

El programa transcripcional global regulado por la vía de señalización Wnt/ β -catenina ha sido examinado principalmente en modelos de cáncer, permitiendo la identificación de nuevos genes potenciales y un mayor entendimiento en las propiedades oncogénicas de esta vía (Hatzis et al., 2008; Taneyhill y Pennica, 2004; Willert et al., 2002). En contraste, aún queda mucho por entender del programa transcripcional modulado por la vía en el sistema nervioso central. En éste contexto, intentos iniciales para identificar nuevos genes regulados por la vía Wnt/ β -catenina en un modelo cerebral, se han mantenido solamente a nivel de análisis *in silico* de los promotores proximales de varios genes enriquecidos en sitios de unión tipo TCF/LEF (Arrazola et al., 2009; Hödar et al., 2010). De manera más reciente, algunas aproximaciones bioinformáticas y transcriptómicas, han sido usadas en neuronas del tálamo (Wisniewska et al., 2012), o células progenitoras neuronales (Wexler et al., 2011), con el fin de identificar nuevos genes regulados por Wnt/ β -catenina, que se encuentren involucrados en los procesos de excitabilidad neuronal o enfermedades neurodegenerativas, entras las cuales se destaca la enfermedad de Alzheimer (Wexler et al., 2011; Wisniewska et al., 2012). En este aspecto, varias líneas de investigación han provisto de evidencia del rol funcional de la señalización de la vía Wnt/ β -catenina en desórdenes neurológicos prevalentes asociados con disfunción sináptica, destacando, desordenes de espectro autista, la enfermedad de Alzheimer o epilepsia (Caracci et al., 2016; De Ferrari y Moon, 2006; De Ferrari et al., 2014; Huang et al., 2015). Sin embargo, a pesar de que estos estudios han generado cientos de nuevos candidatos, la expresión de aquellos genes muestra un mínimo solapamiento (menos del 2.0%) en diferentes linajes celulares, probablemente debido a mecanismos transcripcionales y/o traduccionales específicos de cada tipo celular.

El fin último en la cascada de señalización de la vía Wnt/ β -catenina en las células es modular cambios en la expresión de genes que participan de diversos

procesos celulares. En un contexto neuronal, podemos destacar procesos como la neurogénesis, el remodelamiento axonal, el desarrollo dendrítico, la formación y plasticidad sináptica (Inestrosa y Varela-Nallar, 2014; Salinas, 2012). Estos cambios son probablemente logrados mediante la acción de factores de transcripción que interactúan o son reclutados río abajo de los complejos transcripcionales con β -catenina. De forma interesante, nuestros resultados muestran que una amplia proporción de genes regulados por la vía Wnt/ β -catenina en el hipocampo (18.1%, $n = 28$), serían genes codificando para factores de transcripción. De hecho, entre los 20 genes que más variaron, aumentando su expresión comparado a la condición control, observamos seis factores de transcripción: LEF1, AHR, GATA2, ID2, MSX2 y SP5, los cuales son genes candidatos o compañeros funcionales con otros componentes de la cascada de señalización y, que juegan un rol importante en el desarrollo sináptico. A modo de ejemplo, los factores de transcripción TCF/LEF, son componentes efectores río abajo de la vía Wnt/ β -catenina en la regulación de genes modulados por la misma (Cadigan y Waterman, 2012), lo cual incluye genes candidatos que participan en el desarrollo y función sináptica (Wisniewska et al., 2012). De manera similar, AHR participa en la expresión y presentación hacia la membrana neuronal de receptores de NMDA (Lin et al., 2009). La sobre expresión de GATA2 en neuronas hipocámpales, conlleva una posterior disminución de la densidad de espinas sinápticas y un comportamiento depresivo en ratas (Choi et al., 2014). La familia de los genes ID, incluyendo ID2, son sobre regulados en el síndrome Rett (Peddada et al., 2006), un desorden del neurodesarrollo que se caracteriza por una alterada plasticidad sináptica (Weng et al., 2011). ID2 también es expresado de manera asimétrica en los hemisferios del cerebro humano, sugiriendo un rol para este factor de transcripción en la diferenciación de la corteza (Sun et al., 2005). Sumado a lo anterior, varias de estas proteínas también modulan la activación de la vía de señalización Wnt en otros tejidos, por ejemplo, como consecuencia de la hipoxia inducida por estos mismos factores, lo que promueve la activación de la vía en células madre cancerígenas (Dong et al., 2016; Mimoto et al., 2015; Procházková et al., 2011; Weidinger et al., 2005). Pese a los antecedentes previos, de igual forma es necesaria una validación que incluya un análisis

proteómico, idealmente global y/o, la evaluación de la localización de factores TCF/LEF en el genoma mediante técnicas de ChIP-Seq, con el fin de confirmar estos candidatos potenciales de regulación por esta vía de señalización en células neuronales o de otro linaje. Es importante destacar, por los análisis de solapamiento de genes con aquellos pertenecientes a cascadas transcripcionales secundarias, que ninguno de los genes tempranamente sobre-expresados, posterior a la incubación con WNT3a purificado, pareciera ser resultado de la activación mediada por factores de transcripción río abajo u otras señales secundarias que promuevan la transcripción. Del mismo modo anterior, es necesario discutir el efecto sobre aquellos genes que disminuyen posterior a la activación de la vía de señalización. En este contexto, varios genes blanco de la vía Wnt canónica, han sido reportados como inhibidores de la misma, los que rápidamente promueven su estabilización posterior a su sobre activación, efecto asociado con la mantención de los rangos homeostáticos normales en cada tejido celular. Algunos ejemplos, son proteínas como AXIN2 y NKD1, ambos sobre-expresados con nuestro tratamiento. Axin2 actúa a nivel del complejo de destrucción de β -catenina, reclutando a la misma, promoviendo su posterior degradación y, por ende, afectando la transcripción de genes blanco (Jho et al., 2002). NKD1, inhibe la vía de señalización al generar un complejo proteico que secuestra β -catenina junto a DVL2 en el citoplasma, impidiendo su acción en el núcleo (Larraguibel et al., 2015). Ambos casos, serían candidatos para explicar porque observamos genes que se encuentran disminuyendo sus valores de expresión diferencial con nuestro tratamiento.

Los resultados de los análisis de categorías ontológicas de los 170 candidatos obtenidos con expresión diferencial, posterior a los tratamientos de activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina, representan categorías asociadas con procesos biológicos en desarrollo cerebral, particularmente desarrollo del prosencéfalo, diferenciación de células madre y proliferación de células precursoras neurales. En este aspecto, uno de los roles de los componentes Wnt/ β -catenina en el desarrollo del prosencéfalo ha sido claramente establecido (Harrison-Uy y Pleasure, 2012) y recientemente éste tópico ha recibido considerable atención, asociada

principalmente con el comienzo de desórdenes de espectro autista (Krumm et al., 2014). De igual forma, es bien sabido que la señalización por Wnt promueve la renovación de células precursoras neuronales y es un modulador clave en los procesos de neurogénesis (Kalani et al., 2008). Cabe destacar que, AXIN2, un gen blanco de la vía (Jho et al., 2002) y, que actúa como proteína de andamio en el complejo de destrucción de β -catenina (Kikuchi, 1999), ha sido recientemente reportado como modulador de progenitores desde un estado proliferativo hacia diferenciado en el desarrollo de la corteza cerebral (Fang et al., 2013). Además, el aumento de la expresión de AXIN2 en progenitores neuronales, promueve un aumento del tamaño de la neo-corteza, un aumento y exceso de sinapsis de tipo excitatorio y comportamientos del tipo autista (Fang et al., 2014).

Las aproximaciones basadas en redes de interacción han sido ampliamente utilizadas en el estudio de enfermedades neurológicas, en donde, usualmente el número de marcadores genéticos que excede el umbral de significancia es muy pequeño, así, la mayoría de los marcadores no son aptos para considerarse (Parikshak et al., 2015). Integrar estos marcadores que se encuentran bajo los umbrales de significancia en redes con significancia biológica, ha sido una estrategia exitosa para la identificación de módulos de interacción nuevos en enfermedades como esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, desorden de espectro autista y otros desórdenes (Baranzini et al., 2009; Johnson et al., 2015; Krumm et al., 2014; Pérez et al., 2014). Nuestro análisis de redes de interacción para los genes expresados diferencialmente por el tratamiento con Wnt3a, representaron redes asociando la vía Wnt/ β -catenina con un rol funcional en la secreción de neurotransmisores, aprendizaje y memoria (Módulos M2 y M3). También encontramos un módulo altamente significativo que comprometía componentes del metabolismo de glicerolípidos (M1). Éste módulo se encuentra enriquecido con varias familias de enzimas que modifican lípidos, entre ellas, PI(3)Ks, PLAs, PLCs y PLDs, cuyos productos se encuentran en las membranas sinápticas promoviendo el arribo de vesículas y su liberación al espacio sináptico (Rohrbough y Broadie, 2005). En este aspecto, las PLAs producen ácido araquidónico, precursor que será procesado por COX2, un gen conocido por ser

regulado por la vía Wnt/ β -catenina (Nuñez et al., 2011) durante la generación de varios eicosanoides, los que a su vez median la respuesta inflamatoria (Tamiji y Crawford, 2011). El ácido araquidónico liberado desde los terminales post-sinápticos es capaz de potenciar la transmisión sináptica al inhibir canales de potasio pre-sinápticos (Carta et al., 2014). Se ha reportado que mutaciones del gen que codifica para PLAs podrían encontrarse asociadas con la enfermedad de Alzheimer y desordenes del espectro autista (Sanchez-Mejia y Mucke, 2010; Tamiji y Crawford, 2011). De igual manera, la producción de ácido fosfatídico mediado por PLDs, modula varios aspectos la vía de señalización Wnt/ β -catenina en cáncer y, es presentado como un regulador crítico de la proliferación celular y tumorigénesis (Kang y Choi, 2011).

El módulo M2, se encuentra involucrado con procesos de aprendizaje y memoria, está enriquecido además en componentes de la matriz extracelular, como integrinas y lamininas. En primer lugar, ITGA9 (sub-unidad alfa de la integrina 9), se encuentra entre los 10 genes que más aumentaron su expresión a nivel transcripcional reportados en este estudio. Las integrinas se expresan de manera diferencial en distintas regiones del cerebro adulto (Pinkstaff et al., 1999) e interactúan con RELN (Relina) para activar los procesos de laminación cortical (Dulabon et al., 2000). De manera interesante, la vía de la Relinas presenta una conversación cruzada con la vía de señalización Wnt/ β -catenina a través del desarrollo cerebral (Reiner y Sapir, 2005). También ha sido asociada con la enfermedad de Alzheimer (Herz y Chen, 2006) y desordenes del espectro autista (Zhang et al., 2002). En segundo lugar, el enriquecimiento de sub-unidades de laminina es particularmente llamativo dado que estas son necesarias la formar la ultra estructura sináptica (Egles et al., 2007) y también, ha sido reportado que son capaces de prevenir la agregación del péptido β -amiloide (Morgan e Inestrosa, 2001). En tercer lugar, las moléculas de adhesión celular Neuroligina (NLGN) y Neurexina (NRXN) son esenciales para la estructura y función sinápticas en la hendidura sináptica, además, NLGN3 y NRXN1 han sido asociadas con autismo (Südhof, 2008). Finalmente, los resultados obtenidos de la activación con Wnt3a también permitieron la identificación de la sub-red M3, asociada con la secreción de

neurotransmisores enriquecidos con factores de transcripción pertenecientes a la familia de proteínas de elementos de respuesta a proteínas de unión mediadas por ATP/cAMP (CREB), cuya función está involucrada en la plasticidad sináptica y la memoria (Li et al., 2007; Pasini et al., 2015). De igual forma, el módulo M3 incluye varios genes cuyos productos se encuentran involucrados en la fusión de membrana, exocitosis sináptica y dinámicas pre-sinápticas (Südhof y Rizo, 2011), incluyendo proteínas SNARES (VAMP2, VAMP3 y STX1A), proteínas de unión STX (STXBP1, STXBP5) y moléculas de señalización RAB (RAB3a y RIMS1), las cuales podrían dar antecedentes que sustenten los efectos sinápticos inducidos por la conversación cruzada entra la vía de señalización Wnt canónica y los componentes de la vía Wnt/Calcio y que pudieran ser importantes en la disfunción sináptica de estos desordenes.

9. CONCLUSIÓN

Estos resultados entregan nuevos hallazgos del programa transcripcional global temprano y las redes moleculares moduladas por la vía de señalización Wnt/ β -catenina en neuronas hipocámpales, incluyendo nuevos genes candidatos, genes relacionados con la función sináptica y metabolismo neural. Entre estos destaca la sobre representación de categorías ontológicas asociadas con proliferación, diferenciación de células madre en el cerebro y desarrollo del prosencéfalo. Del mismo modo, en un contexto de interacción de redes, términos ontológicos asociados con procesos metabólicos de glicerolípidos, aprendizaje, memoria y liberación de neurotransmisores, procesos biológicos previamente relacionados con componentes sinápticos, respondiendo la hipótesis de la presente tesis. La transcriptómica y los análisis de redes se han convertido en herramientas sumamente útiles en la identificación de nuevos candidatos que pueden proveer un mejor entendimiento de los cambios celulares durante el comienzo o la progresión de enfermedades neurodegenerativas o del neurodesarrollo.

10. PROYECCIONES

Al ser capaz de obtener listas de interesantes genes candidatos para posteriores análisis, donde además, podemos centrarnos en aquellos que hayan sido previamente asociados con enfermedades neurodegenerativas, contrastando con reportes previos y genes que podrían regularse de forma directa a través de componentes de la vía de señalización canónica Wnt. Acorde a lo anterior, una buena manera de encontrar y validar a los genes candidatos sería la realización de análisis ChIP-Seq o *in silico* de los promotores de dichos genes, lo cual sería muy útil para establecer una asociación más significativa. También se recomienda complementar estos estudios con perfiles proteómicos globales. Con lo anterior, esperamos lograr abrir una nueva ventana a un mejor entendimiento en los mecanismos de elementos regulatorios presentes en la formación y desarrollo de la sinapsis, así mismo de su asociación con enfermedades neurológicas prevalentes.

11.REFERENCIAS

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., & Kemler, R. (1997). B-Catenin Is a Target for the Ubiquitin Proteasome Pathway. *EMBO J.*, 16(13), 3797–3804.
- Aguayo L. G, Pancetti F. C. (1994). Ethanol modulation of the gamma-aminobutyric acid- and glycine-activated Cl⁻ current in cultured mouse neurons, *J Pharmacol. Exp. Ther.* 270(1):61-69.
- Ahmad-Annur, A., Ciani, L., Simeonidis, I., Herreros, J., Fredj, N. Ben, Rosso, S. B., Salinas, P. C. (2006). Signaling across the synapse: A role for Wnt and Dishevelled in presynaptic assembly and neurotransmitter release. *J. Cell Biol.*, 174(1), 127–139. <http://doi.org/10.1083/jcb.200511054>
- Albasanz J. L., Dalfó E., Ferrer I., Martín M. (2005). Impaired metabotropic glutamate receptor/phospholipase C signaling pathway in the cerebral cortex in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies correlates with stage of Alzheimer's-disease-related changes. *Neurobiol. Dis.* 20:685-693.
- Andersen C. L., Jensen J. L., Orntoft T. F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 64:5245-5250.
- Aronica E., Dickson D. W., Kress Y., Morrison J. H., & Zukin R. S. (1998). Non-plaque dystrophic dendrites in Alzheimer hippocampus: a new pathological structure revealed by glutamate receptor immunocytochemistry. *Neuroscience.* 82(4):979–91.
- Arrázola M. S., Varela-Nallar L., Colombres M., Toledo E. M., Cruzat F., Pavez L., Assar R., Aravena A., González M., Montecino M., Maass A., Martínez S., Inestrosa N. C. (2009). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type IV is a target gene of the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *J. Cell. Physiol.* 221(3):658–67.
- Avila M. E., Sepulveda F. J., Burgos C. F., Moraga-Cid G., Parodi J., Moon R. T., Opazo C., De Ferrari G. V. (2010). Canonical Wnt3a Modulates Intracellular Calcium and Enhances Excitatory Neurotransmission in Hippocampal Neurons. *J. Biol. Chem.* 285:18939-18947.
- Bamji X. Shernaz, Kazuhiro Shimazu, Nikole Kimes, Joerg Huelsken, W., & Birchmeier. (2009). Role of β -Catenin in Synaptic Vesicle Localization and Presynaptic Assembly. *Neuron*, 11(5), 447–453. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2008.09.004>.Bacteriophage

- Baranzini, S. E., Galwey, N. W., Wang, J., Khankhanian, P., Lindberg, R., Pelletier, D., Barnes, M. R. (2009). Pathway and network-based analysis of genome-wide association studies in multiple sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* 18(11), 2078–2090. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddp120>
- Benjamini, Y., Drai, D., Elmer, G., Kafkafi, N., Golani, I. (2001). Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav. Brain Res.* 125, 279–284.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. Roy. Stat. Soc.* <http://doi.org/10.2307/2346101>
- Bettens, K., Sleegers, K., Van Broeckhoven, C. (2010). Current status on Alzheimer disease molecular genetics: from past, to present, to future. *Hum. Mol. Genet.* 19: R4–R11.
- Braak, H., Braak, E. (1998). Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease. *J. Neural Transm. Suppl.* 53:127-40.
- Budnik V., & Salinas P. (2011). Wnt signaling during synaptic development and plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 21(1):151–159.
- Bustin S. A., Benes V., Garson J. A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M. W., Shipley G. L. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55:611.
- Buxbaum J. (2009). Multiple rare variants in the etiology of autism spectrum disorders. *Dial. Clin. Neurosci.* 11:35–43.
- Cadigan, K. M., & Peifer, M. (2009). Wnt signaling from development to disease: insights from model systems. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1(2), a002881. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a002881>
- Cadigan, K. M., & Waterman, M. L. (2012). TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4(11), 1–22. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a007906>
- Caracci, M. O., Ávila, M. E., & Ferrari, G. V. De. (2016). Synaptic Wnt / GSK3 beta Signaling Hub in Autism. *Neural Plast.* <http://doi.org/10.1155/2016/9603751>
- Caricasole, A., Ferraro, T., Iacovelli, L., Barletta, E., Caruso, A., Melchiorri, D., Nicoletti, F. (2003). Functional characterization of WNT7A signaling in PC12 cells: Interaction with a FZD5-LRP6 receptor complex and modulation by Dickkopf proteins. *J. Biol. Chem.* 278(39), 37024–37031. <http://doi.org/10.1074/jbc.M300191200>

- Carta, M., Lanore, F., Rebola, N., Szabo, Z., Da Silva, S. V., Lourenço, J., Mulle, C. (2014). Membrane lipids tune synaptic transmission by direct modulation of presynaptic potassium channels. *Neuron*, 81(4), 787–799. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.028>
- Cerpa W., Godoy J. A, Alfaro I., Farías G. G., Metcalfe M. J., Fuentealba R., Bonansco C., Inestrosa, N. C. (2008). Wnt-7a modulates the synaptic vesicle cycle and synaptic transmission in hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 283(9):5918–27.
- Cerpa W., & Gambrell A. (2011). Regulation of NMDA-receptor synaptic transmission by Wnt signaling. *J. Neurosci.* 31(26):9466–9471.
- Chen J., Park C. S., & Tang S. J. (2006). Activity-dependent synaptic Wnt release regulates hippocampal long term potentiation. *J. Biol. Chem.* 281(17):11910–11916.
- Choi, M., Wang, S. E., Ko, S. Y., Kang, H. J., Chae, S. Y., Lee, S. H., Son, H. (2014). Overexpression of human GATA-1 and GATA-2 interferes with spine formation and produces depressive behavior in rats. *PLoS ONE*, 9(10), 1–10. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0109253>
- Ciani L., Boyle K., & Dickins E. (2011). Wnt7a signaling promotes dendritic spine growth and synaptic strength through Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 108:10732-10737.
- Clevers, H., & Nusse, R. (2012). Wnt/b-catenin signaling and disease. *Cell*, 149(6), 1192–1205. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.012>
- Colantuoni Carlo, Lipska Barbara K., Ye Tianzhang, Hyde Thomas M., Tao Ran, Leek Jeffrey T., Colantuoni Elizabeth A., Elkahloun Abdel G., Herman Mary M., Weinberger Daniel R., and J. E. K. (2012). Temporal dynamics and genetic control of transcription in the human prefrontal cortex. *Nature*, 29(6), 997–1003. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>. Secreted
- Danbolt NC. (2001). Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65:1-105.
- Davis E. K., Zou Y., & Ghosh A. (2008). Wnts acting through canonical and noncanonical signaling pathways exert opposite effects on hippocampal synapse formation. *Neural Dev.* 3:32.
- De Ferrari GV, Avila ME, Medina MA, Perez-Palma E, Bustos BI, et al. (2014) Wnt/beta-catenin signaling in Alzheimer's disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 13: 745-754.
- De Ferrari and, G. V., & Inestrosa, N. C. (2000). Wnt signaling function in Alzheimer's disease. *Brain Res. Rev.* 33(1), 1–12. [http://doi.org/10.1016/S0165-0173\(00\)00021-7](http://doi.org/10.1016/S0165-0173(00)00021-7)
- De Ferrari G. V., Moon R. T. (2006). The ups and downs of Wnt signaling in prevalent neurological disorders. *Oncogene.* 25:7545-7553.

De Ferrari G.V., E Avila M, A Medina M, Pérez-Palma E, I Bustos B, et al. (2014). Wnt/ β -Catenin Signaling in Alzheimer's Disease. *CNS Neurolog. Disorders-Drug Targets*. 13: 745-754.

DeKosky, ST., Scheff, SW., Styren, SD. (1996). Structural correlates of cognition in dementia: quantification and assessment of synapse change. *Neurodegeneration*. 5:417-21.

Dewar D., Chalmers D. T., Graham D. I., & McCulloch J. (1991). Glutamate metabotropic and AMPA binding sites are reduced in Alzheimer's disease: an autoradiographic study of the hippocampus. *Brain Research*. 553(1):58–64.

Dong, H.-J., Jang, G.-B., Lee, H.-Y., Park, S.-R., Kim, J.-Y., Nam, J.-S., & Hong, I.-S. (2016). The Wnt/ β -catenin signaling/Id2 cascade mediates the effects of hypoxia on the hierarchy of colorectal-cancer stem cells. *Sci. Rep.* 6, 22966. <http://doi.org/10.1038/srep22966>

Dulabon, L., Olson, E. C., Taglienti, M. G., Eisenhuth, S., McGrath, B., Walsh, C. A., Anton, E. S. (2000). Reelin binds $\alpha 3 \beta 1$ integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron*, 27(1), 33–44. [http://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00007-6](http://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00007-6)

Duman, R. S., Aghajanian, G. K., & Haven, N. (2015). Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets, 338(6103), 68–72. <http://doi.org/10.1126/science.1222939>. Synaptic

Egles, C., Claudepierre, T., Manglapus, M. K., Champliand, M. F., Brunken, W. J., & Hunter, D. D. (2007). Laminins containing the $\beta 2$ chain modulate the precise organization of CNS synapses. *Mol. Cell. Neurosci.* 34(3), 288–298. <http://doi.org/10.1016/j.mcn.2006.11.004>

Ettenberg, S. A., Charlat, O., Daley, M. P., Liu, S., Vincent, K. J., Stuart, D. D., Cong, F. (2010). Inhibition of tumorigenesis driven by different Wnt proteins requires blockade of distinct ligand-binding regions by LRP6 antibodies. *P. Natl. Acad. Sci. USA*. 107(35), 15473–8. <http://doi.org/10.1073/pnas.1007428107>

Fang, W. Q., Chen, W. W., Fu, A. Y., & Ip, N. (2013). Axin directs the amplification and differentiation of intermediate progenitors in the developing cerebral cortex. *Neuron*, 79(4), 665–679. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.06.017>

Fang, W. Q., Chen, W. W., Jiang, L., Liu, K., Yung, W. H., Fu, A. K. Y., & Ip, N. Y. (2014). Overproduction of Upper-Layer Neurons in the Neocortex Leads to Autism-like Features in Mice. *Cell Reports*, 9(5), 1635–1644. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.11.003>

Fernández E., Collins M. O., Uren R. T., Kopanitsa M. V., Homiyama N. H., Croning M. D., Zografos L., Armstrong J. D., Choudhary J. S., Grant S. G. (2009). Targeted tandem affinity purification of PSD-95 recovers core postsynaptic complexes and schizophrenia susceptibility proteins. *Mol. Syst. Biol.* 5:10-27.

- Ferraguti F, Shigemoto R. (2006). Metabotropic glutamate receptors. *Cell. Tissue Res.* 326:483-504.
- Francis PT. (2003). Glutamatergic systems in Alzheimer's disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry.* 18:S15-21.
- Freneau RT Jr, Troyer MD, Pahner I, et al. (2001). The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron.* 31:247-60.
- Grossmann S, Bauer S, Robinson PN, Vingron M. (2007). Improved detection of overrepresentation of Gene-Ontology annotations with parent child analysis. *Bioinformatics.* 23(22):3024-31. doi: 10.1093/bioinformatics/btm440
- Grove E., Tole S., Limon J., Yip L., & Ragsdale C. W. (1998). The hem of the embryonic cerebral cortex is defined by the expression of multiple Wnt genes and is compromised in Gli3-deficient mice. *Development.* 125(12):2315–2325.
- Gujral, T. S., & MacBeath, G. (2010). A system-wide investigation of the dynamics of Wnt signaling reveals novel phases of transcriptional regulation. *PLoS One*, 5(4), e10024. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0010024>
- Guryev, V., Saar, K., Adamovic, T., Verheul, M., van Heesch, S. A. A. C., Cook, S., Cuppen, E. (2008). Distribution and functional impact of DNA copy number variation in the rat. *Nature Genetics*, 40(5), 538–45. <http://doi.org/10.1038/ng.141>
- Hall A., Lucas F., & Salinas P. (2000). Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling. *Cell.* 100:525–535.
- Harrison-Uy, S. J., & Pleasure, S. J. (2012). Wnt signaling and forebrain development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4(7), 1–11. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a008094>
- Hart, M. J., de los Santos, R., Albert, I. N., Rubinfeld, B., & Polakis, P. (1998). Downregulation of β -catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, β -catenin and GSK3 β . *Curr. Biol.* 8(10), 573–581. [http://doi.org/10.1016/S0960-9822\(98\)70226-X](http://doi.org/10.1016/S0960-9822(98)70226-X)
- Hatzis, P., van der Flier, L. G., van Driel, M. A., Guryev, V., Nielsen, F., Denissov, S., Stunnenberg, H. G. (2008). Genome-wide pattern of TCF7L2/TCF4 chromatin occupancy in colorectal cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* 28(8), 2732–44. <http://doi.org/10.1128/MCB.02175-07>
- Hawrylycz MJ, Lein ES, Guillozet-Bongaarts AL, Shen EH, Ng L, Miller JA, van de Lagemaat LN, Smith KA, Ebbert A, Riley ZL, Abajian C, Beckmann CF, Bernard A, Bertagnolli D, Boe AF, Cartagena PM, Chakravarty MM, Chapin M, Chong J, Dalley RA, Daly BD, Dang, J. A. (2014). An anatomically

comprehensive atlas of the adult human brain transcriptome. *Nature*, 489(7416), 391–399. <http://doi.org/10.1038/nature11405>.An

He, X., Semenov, M., Tamai, K., & Zeng, X. (2004). LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development (Cambridge, England)*, 131(8), 1663–77. <http://doi.org/10.1242/dev.01117>

Henrichsen, C. N., Vinckenbosch, N., Zöllner, S., Chaignat, E., Pradervand, S., Schütz, F., Reymond, A. (2009). Segmental copy number variation shapes tissue transcriptomes. *Nat. Genet.* 41(4), 424–9. <http://doi.org/10.1038/ng.345>

Herz, J., & Chen, Y. (2006). Reelin, lipoprotein receptors and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 7(11), 850–859. <http://doi.org/10.1038/nrn2009>

Hödar, C., Assar, R., Colombres, M., Aravena, A., Pavez, L., González, M., Maass, A. (2010). Genome-wide identification of new Wnt/beta-catenin target genes in the human genome using CART method. *BMC Genomics*, 11, 348. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-11-348>

Hollis, E. R., & Zou, Y. (2012). Expression of the Wnt signaling system in central nervous system axon guidance and regeneration. *Front. Mol. Neurosci.* 5, 5. <http://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00005>

Houart C., Caneparo L., Heisenber C. P., Barth A. K., Take-Uchi M., Wilson S. W. (2002). Establishment of the telencephalon during gastrulation by local antagonism of Wnt signaling. *Neuron*. 35(2):255-265.

Huang, C., Fu, X.-H., Zhou, D., & Li, J.-M. (2015). The Role of Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Disrupted Hippocampal Neurogenesis of Temporal Lobe Epilepsy: A Potential Therapeutic Target? *Neurochem. Res.* 40(17), 1–14. <http://doi.org/10.1007/s11064-015-1614-1>

Ideker T, Ozier O, Schwikowski B, Siegel AF. (2002). Discovering regulatory and signalling circuits in molecular interaction networks. *Bioinformatics*. 18 Suppl. 1:S233-40.

Inestrosa, N. C., & Arenas, E. (2010). Emerging roles of Wnts in the adult nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 11(2), 77–86. <http://doi.org/10.1038/nrn2755>

Inestrosa N. C., Montecinos-Oliva C., & Fuenzalida M. (2012). Wnt signaling: role in Alzheimer disease and schizophrenia. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 7(4):788–807.

Inestrosa, N. C., & Varela-nallar, L. (2014). Wnt signaling in the nervous system and in Alzheimer ' s disease. *J. Mol. Cell Biol.* 6, 64–74.

- Itasaki, N., Jones, C. M., Mercurio, S., Rowe, A., Domingos, P. M., Smith, J. C., & Krumlauf, R. (2003). Wise, a context-dependent activator and inhibitor of Wnt signalling. *Development (Cambridge, England)*, 130, 4295–4305. <http://doi.org/10.1242/dev.00674>
- Iwai, Y., Hirota, Y., Ozaki, K., Okano, H., Takeichi, M., & Uemura, T. (2002). DN-cadherin is required for spatial arrangement of nerve terminals and ultrastructural organization of synapses. *Mol. Cell. Neurosci.* 19(3), 375–88. <http://doi.org/10.1006/mcne.2001.1081>
- Jho, E., Zhang, T., Domon, C., Joo, C.-K., Freund, J.-N., & Costantini, F. (2002). Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 22(4), 1172–83. <http://doi.org/10.1128/MCB.22.4.1172>
- Jiang M., & Chen G. (2006). High Ca²⁺-phosphate transfection efficiency in low-density neuronal cultures. *Nat. protocols.* 1(2):695–700.
- Johnson, M., Shkura, K., Langley, S., Delahaye-Duriez, A., Srivastava, P., & Al., E. (2015). Systems genetics identifies a convergent gene network for cognition and neurodevelopmental disease. *Nature Neurosci.* 19(2), 1–10. <http://doi.org/10.1038/nn.4205>
- Jungling, K., Eulenburg, V., Moore, R., Kemler, R., Lessmann, V., & Gottmann, K. (2006). N-Cadherin Transsynaptically Regulates Short-Term Plasticity at Glutamatergic Synapses in Embryonic Stem Cell-Derived Neurons, 26(26), 6968–6978. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1013-06.2006>
- Kalani, M. Y. S., Cheshier, S. H., Cord, B. J., Bababeygy, S. R., Vogel, H., Weissman, I. L., ... Nusse, R. (2008). Wnt-mediated self-renewal of neural stem/progenitor cells. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 105(44), 16970–5. <http://doi.org/10.1073/pnas.0808616105>
- Kang, D. W., Choi, K.-Y., & Min, D. S. (2011). Phospholipase D meets Wnt signaling: a new target for cancer therapy. *Cancer Res.* 71(2), 293–297. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2463>
- Kang, H. J., Kawasawa, T. I., Cheng, F., Zhu, Y., Xu, X., Li, M., Sestan, N. (2011). Spatiotemporal transcriptome of the human brain. *Nature*, 478(7370), 483–489. <http://doi.org/10.1038/nature10523>
- Kelleher R. J., Geigenmüller U., Hovhannisyan H., Trautman E., Pinard R., Rathmell B., Carpenter R. (2012). High-throughput sequencing of mGluR signaling pathway genes reveals enrichment of rare variants in autism. *PloS one.* 7(4):e35003.
- Kew JN, Kemp JA. (2005). Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)* 2005;179:4-29.

Kikuchi, A. (1999). Roles of axin in the Wnt signalling pathway. *Cell. Signal.* 11(11), 777–788. [http://doi.org/10.1016/S0898-6568\(99\)00054-6](http://doi.org/10.1016/S0898-6568(99)00054-6)

Kirov G., Pocklington A. J., Holmans P., Ivanov D., Ikeda M., Ruderfer D., Moran J., Chambert K., Toncheva D., Georgieva L., Grozeva D., Fjodorova M., Wollerton R., Rees E., Nikolov I., van de Lagemaat L. N., Bayés À., Fernandez E., Olason P. I., Böttcher Y., Komiyama N. H., Collins M. O., Choudhary J., Stefansson K., Stefansson H., Grant S. G. N., Purcell S., Sklar P., O'Donovan M. C., Owen M. J. (2012). De novo CNV analysis implicates specific abnormalities of postsynaptic signaling complexes in the pathogenesis of schizophrenia. *Mol. Psychiatry.* 17:142-153.

Kishida, S., Hamao, K., Inoue, M., Hasegawa, M., Matsuura, Y., Mikoshiba, K., Kikuchi, A. (2007). Dvl regulates endo- and exocytotic processes through binding to synaptotagmin. *Genes to Cells.* 12(1), 49–61. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2006.01030.x>

Klein P. S., Melton D. A. (1996). A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:8455–8459.

Klyubin I, Wang Q, Reed MN, Irving EA, Upton N, Hofmeister J, Cleary JP, Anwyl R, Rowan MJ. (2009). Protection against Abeta-mediated rapid disruption of synaptic plasticity and memory by memantine. *Neurobiol. Aging.* 32, 614-623.

Krumm, N., O'Roak, B. J., Shendure, J., & Eichler, E. E. (2014). A de novo convergence of autism genetics and molecular neuroscience. *Trends Neurosci.* 37(2), 95–105. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2013.11.005>

Lambert JC, Schraen-Maschke S, Richard F, Fievet N, Rouaud O, et al. (2009). Association of plasma amyloid beta with risk of dementia: the prospective Three-City Study. *Neurology.* 73: 847–853.

Larraguibel J., Weiss A., Pasula D., Dhaliwal R., Kondra R. and Van Raay T. (2015). Wnt ligand-dependent activation of the negative feedback regulator Nkd1. *MBoC*, 26(12): 2375-2384.

Lee H., Ogawa O., Zhu X., O'Neill M. J., Petersen R. B., Castellani R. J., Ghanbari H., Perry G., Smith M. (2004). Aberrant expression of metabotropic glutamate receptor 2 in the vulnerable neurons of Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica.* 107(4):365–71.

Lee S. M., Tole S., Grove E., & McMahon P. (2000). A local Wnt-3a signal is required for development of the mammalian hippocampus. *Development.* 127(3):457–67.

Li, J., Sutter, C., Parker, D. S., Blauwkamp, T., Fang, M., & Cadigan, K. M. (2007). CBP/p300 are bimodal regulators of Wnt signaling. *The EMBO Journal*, 26(9), 2284–2294. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601667>

- Li S, Hong S, Shepardson NE, Walsh DM, Shankar GM, Selkoe D. (2009). Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron* **62**, 788-801.
- Li, Y., Szigeti, K., Shaw, C., Sheffer, I., Sule, N., Powell, S., Doody, R. (2012). Integrated copy number and gene expression analysis detects a CREB1 association with Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 8(4), P672. <http://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.05.1817>
- Lie D. C., Colamarino S. A, Song H. J., Désiré L., Mira H., Consiglio A., Lein E. S. (2005). Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature*. **437**(7063):1370–1375.
- Lin, C. H., Chen, C. C., Chou, C. M., Wang, C. Y., Hung, C. C., Chen, J. Y., Lee, Y. H. (2009). Knockdown of the aryl hydrocarbon receptor attenuates excitotoxicity and enhances NMDA-induced BDNF expression in cortical neurons. *J. Neurochem.* **111**(3), 777–789. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06364.x>
- Lipina, T. V., Kaidanovich-Beilin, O., Patel, S., Wang, M., Clapcote, S. J., Liu, F., Roder, J. C. (2011). Genetic and pharmacological evidence for schizophrenia-related Disc1 interaction with GSK-3. *Synapse*, **65**(3), 234–248. <http://doi.org/10.1002/syn.20839>
- Livak K. J., Schmittgen T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods*. **25**:402-408.
- Llaneza D. C., Deluke S. V, Batista M., Crawley J. N., Kristin V., & Frye C. A. (2011). Communication, Interventions, and Scientific Advances in Autism: A Commentary. *Physiol. Behav.* **100**(3):268–276.
- Mandolesi, G. (2015). Synaptopathy connects inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* **11**, 711–724. <http://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.222>
- Marballi K., Cruz D., Thompson P., & Walss-Bass C. (2012). Differential neuregulin 1 cleavage in the prefrontal cortex and hippocampus in schizophrenia and bipolar disorder: preliminary findings. *PloS one*. **7**(5): e36431.
- Maretto S., Cordenonsi M., Dupont S., Braghetta P., Broccoli V., Hassan B., Volpin D., Bressan G., Piccolo S. (2003). Mapping Wnt/beta-catenin signaling during mouse development and in colorectal tumors. *P. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**(6):3299–304.
- Matsui T., Ingelsson M., Fukumoto H., Ramasamy K., Kowa H., Frosch M. P., Irizarry M. C., Hyman B. T. (2007). Expression of APP pathway mRNAs and proteins in Alzheimer's disease. *Brain Res.* **1161**:116-123.

- Medina, M. A., Ugarte, G. D., Vargas, M. F., Avila, M. E., Necuñir, D., Elorza, A. A., De Ferrari, G. V. (2016). Alternative RUNX1 Promoter Regulation by Wnt/ β -Catenin Signaling in Leukemia Cells and Human Hematopoietic Progenitors. *J. Cell. Physiol.* 231(7), 1460–1467. <http://doi.org/10.1002/jcp.25258>
- Mimoto S., Kwon Sunjong, Song Green Yangsook, D. G., & Christian, and J. L. (2015). GATA2 regulates Wnt signaling to promote primitive red blood cell fate. *Dev. Biol.* 116(8), 1477–1490. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303790>.The
- Moon R. T., Kohn A. D., De Ferrari G. V., & Kaykas A. (2004). WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat. Rev. Genet.* 5(9):691–701.
- Morgan, C., & Inestrosa, N. C. (2001). Interactions of laminin with the amyloid β peptide. Implications for Alzheimer's disease. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34(5), 597–601. <http://doi.org/10.1590/S0100-879X2001000500006>
- Nuñez, F., Bravo, S., Cruzat, F., Montecino, M., & De Ferrari, G. V. (2011). Wnt/ β -catenin signaling enhances cyclooxygenase-2 (COX2) transcriptional activity in gastric cancer cells. *PLoS One*, 6(4), e18562. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0018562>
- Nusse R. (2012). Wnt signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4(5).
- Oliva, C. A., Vargas, J. Y., & Inestrosa, N. C. (2013). Wnt signaling: Role in LTP, neural networks and memory. *Ageing Research Reviews*, 12(3), 78–800. <http://doi.org/10.1016/j.arr.2013.03.006>
- Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. (1998). Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 54:581-618.
- Palop JJ, Mucke L Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: From synapses toward neural networks. *Nat Neurosci* 13, 812-818.
- Palop JJ, Mucke L. (2010). Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: From synapses toward neural networks. *Nat. Neurosci.* 13:812–818.
- Parikshak, N. N., Gandal, M. J., & Geschwind, D. H. (2015). Systems biology and gene networks in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Genet.* 16(8), 441–458. <http://doi.org/10.1038/nrg3934>
- Pasini S, Corona C, Liu J, Greene LA, S. M. (2015). Specific downregulation of hippocampal ATF4 reveals a necessary role in synaptic plasticity and memory. *Cell Reports*, 33(4), 395–401. <http://doi.org/10.1038/nbt.3121>.ChIP-nexus

Peça J., Feliciano C., Ting J., & Wang W. (2011). Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature*. 472(7344):437–442.

Peddada, S., Yasui, D. H., & LaSalle, J. M. (2006). Inhibitors of differentiation (ID1, ID2, ID3 and ID4) genes are neuronal targets of MeCP2 that are elevated in Rett syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 15(12), 2003–2014. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddl124>

Pellegrini-Giampietro D., Bennett M., & Zukin R. (1994). AMPA/kainate receptor gene expression in normal and Alzheimer's disease hippocampus. *Neuroscience*. 61(1).

Pérez-Palma E., Bustos B. I., Villamán C. F., Alarcón M. A, Avila M. E., Ugarte G. D., Reyes A., Opazo C., De Ferrari, G. V. (2014). Overrepresentation of glutamate signaling in Alzheimer's disease: network-based pathway enrichment using meta-analysis of genome-wide association studies. *PLoS one*. 9(4):e95413.

Petralia R. S., Sans N., Wang Y. X., & Wenthold R. J. (2005). Ontogeny of postsynaptic density proteins at glutamatergic synapses. *Mol. Cell. Neurosci.* 29(3):436–52.

Pfaffl M. W., Tichopad A., Prgomet C., Neuvians T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 26:509-515.

Pinkstaff, J. K., Detterich, J., Lynch, G., & Gall, C. (1999). Integrin subunit gene expression is regionally differentiated in adult brain. *J. Neurosci.: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(5), 1541–1556.

Procházková, J., Kabátková, M., Bryja, V., Umannová, L., Bernatík, O., Kozubík, A., Vondráček, J. (2011). The interplay of the aryl hydrocarbon receptor and beta-catenin alters both AhR-dependent transcription and wnt/beta-catenin signaling in liver progenitors. *Toxicol. Sci.* 122(2), 349–360. <http://doi.org/10.1093/toxsci/kfr129>

Reiner, O., & Sapiro, T. (2005). Similarities and differences between the Wnt and reelin pathways in the forming brain. *Mol. Neurobiol.* 31(1–3), 117–34. <http://doi.org/10.1385/MN:31:1-3:117>

Revett T. J., Baker G. B., Jhamandas J., Kar S. (2012). Glutamate system, amyloid β peptides and tau protein: functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology. *J Psychiatry. Neurosci.* 38:6-23.

Rohrbough, J., & Broadie, K. (2005). Lipid regulation of the synaptic vesicle cycle. *Nat. Rev. Neurosci.* 6(2), 139–150. <http://doi.org/10.1038/nrn1608>

Sanchez-Mejia, R. O., & Mucke, L. (2010). Phospholipase A2 and arachidonic acid in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1801(8), 784–90. <http://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.05.013>

Salinas, P. C. (2012). Wnt signaling in the vertebrate central nervous system: From axon guidance to synaptic function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4(2). <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a008003>

Selkoe DJ, Schenk D. (2003). Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43:545-84.

Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ. (2008). Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* 14, 837-842.

Sharma, K., Choi, S. Y., Zhang, Y., Nieland, T. J. F., Long, S., Li, M., & Haganir, R. L. (2013). High-throughput genetic screen for synaptogenic factors: Identification of lrp6 as critical for excitatory synapse development. *Cell Reports*, 5(5), 1330–1341. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.11.008>

Shao C. Y., Mirra S. S., Sait H. B. R., Sacktor T. C., Sigurdsson E. M. (2011). Postsynaptic degeneration as revealed by PSD-95 reduction occurs after advanced A β and tau pathology in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 122:285-292.

Sheng M., & Hoogenraad, C. C. (2007). The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annual Rev. Biochem.* 76:823–847.

Sheng, M., Sabatini, B. L., & Su, T. C. (2016). Synapses and Alzheimer' s Disease, 1–18. <http://doi.org/10.1007/s10571-016-0386-8>

Sodhi M. S., Simmons M., McCullumsmith R., Haroutunian V., Meador-Woodruff J. H. (2011). Glutamatergic gene expression is specifically reduced in thalamocortical projecting relay neurons in schizophrenia. *Biol. Psychiatry.* 70:646-654.

Staal, F. J. T., Luis, T. C., & Tiemessen, M. M. (2008). WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. *Nat. Rev. Immunol.* 8(8), 581–93. <http://doi.org/10.1038/nri2360>

Steinberg K. M., Ramachandran D., Patel V. C., Shetty A. C., Cutler D. J., & Zwick M. E. (2012). Identification of rare X-linked neuroligin variants by massively parallel sequencing in males with autism spectrum disorder. *Mol. autism.* 3(1):8.

Südhof, T. C. (2008). Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature*, 455(7215), 903–11. <http://doi.org/10.1038/nature07456>

Südhof, T. C., & Rizo, J. (2011). Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3(12), 1–14. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a005637>

Sun, T., Patoine, C., Abu-khalil, A., Visvader, J., Sum, E., Timothy, J., Walsh, C. a. (2005). Early asymmetry of gene transcription in embryonic human left and right cerebral cortex. *Science*, 308(5729), 1794–1798. <http://doi.org/10.1126/science.1110324>.Early

Sun Y, Aiga M, Yoshida E, Humbert PO, B. S. (2009). Scribble Interacts with -Catenin to Localize Synaptic Vesicles to Synapses. *Mol. Biol. Cell.* 20(4), 327–331. <http://doi.org/10.1091/mbc.E08>

Swaminathan, S., Huentelman, M. J., Corneveaux, J. J., Myers, A. J., Faber, K. M., Foroud, T., Saykin, A. J. (2012). Analysis of Copy Number Variation in Alzheimer's Disease in a Cohort of Clinically Characterized and Neuropathologically Verified Individuals. *PLoS ONE*, 7(12). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0050640>

Szigetia Kinga, Deepika Lal, Yanchun Li, Rachelle S. Doody, Kirk Wilhelmsen, L. Y., & Song Liu, Changxing Ma, and T. T. A. R. and C. C. (2013). Genome-Wide Scan for Copy Number Variation Association with Age at Onset of Alzheimer's Disease. *J. Alz. Dis.* 27(9), 1571–1578. <http://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-395>.Knowledge

Szklarczyk D, Franceschini A, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, Minguéz P, et al. (2011). The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucl. Acid. Res.* 39(Database issue): D561-8. doi: 10.1093/nar/gkq973.

Tabatadze N., Tomas C., & McGonigal R. (2012). Wnt transmembrane signaling and long-term spatial memory. *Wiley Periodicals.* 22:1228–1241.

Tamiji, J., & Crawford, D. a. (2010). The neurobiology of lipid metabolism in autism spectrum disorders. *Neuro-Signals*, 18(2), 98–112. <http://doi.org/10.1159/000323189>

Taneyhill, L., & Pennica, D. (2004). Identification of Wnt responsive genes using a murine mammary epithelial cell line model system. *BMC Developmental Biology*, 4(1), 6.

Takeichi M., Abe K. (2005). Synaptic contact dynamics controlled by cadherin and catenins. *Trends Cell Biol.* 15:216–221.

The Encyclopedia of DNA Elements Consortium. (2011). *Standards, Guidelines and Best Practices for RNA-Seq*. US National Human Genome Research Institute. pp.1–7. Available at: http://encodeproject.org/ENCODE/protocols/dataStandards/ENCODE_RNAseq_Standards_V1.0.pdf.

- Togashi, H., Abe, K., Mizoguchi, A., Takaoka, K., Chisaka, O., & Takeichi, M. (2002). Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis. *Neuron*, 35(1), 77–89. [http://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00748-1](http://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00748-1)
- Ugarte, G. D., Vargas, M. F., Medina, M. A., León, P., Necuñir, D., Elorza, A. A., De Ferrari, G. V. (2015). Wnt signaling induces transcription, spatial proximity, and translocation of fusion gene partners in human hematopoietic cells. *Blood*, 126(15), 1785–1789. <http://doi.org/10.1182/blood-2015-04-638494>
- Van Amerongen R., Nusse R. (2009). Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development*. 136(19):3205–3214.
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3: RESEARCH0034.
- Varela-Nallar L., Grabowski C. P., Alfaro I. E., Alvarez A. R., & Inestrosa N. C. (2009). Role of the Wnt receptor Frizzled-1 in presynaptic differentiation and function. *Neural development*. (4):41.
- Varela-nallar, L., Alfaro, I. E., Serrano, F. G., Parodi, J., & Inestrosa, N. C. (2010). Synaptic Differentiation and Function of Glutamatergic Synapses, 10–15.
- Vogt KE, Nicoll RA. (1999). Glutamate and γ -aminobutyric acid mediate a heterosynaptic depression at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96:1118-22.
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2010). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature*, 10(1), 57–63. <http://doi.org/10.1038/nrg2484>.RNA-Seq
- Weidinger, G., Thorpe, C. J., Wuennenberg-Stapleton, K., Ngai, J., & Moon, R. T. (2005). The Sp1-related transcription factors sp5 and sp5-like act downstream of Wnt/catenin signaling in mesoderm and neuroectoderm patterning. *Curr. Biol.* 15(6), 489–500. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2005.01.041>
- Weng, S. M., McLeod, F., Bailey, M. E. S., & Cobb, S. R. (2011). Synaptic plasticity deficits in an experimental model of rett syndrome: Long-term potentiation saturation and its pharmacological reversal. *Neuroscience*, 180, 314–321. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.01.061>
- Wexler, E. M., Rosen, E., Lu, D., Osborn, G. E., Martin, E., Raybould, H., & Geschwind, D. H. (2011). Genome-wide analysis of a Wnt1-regulated transcriptional network implicates neurodegenerative pathways. *Sci. Signal.* 4(193), ra65. <http://doi.org/10.1126/scisignal.2002282>

- Willert, J., Epping, M., Pollack, J. R., Brown, P. O., & Nusse, R. (2002). A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells. *BMC Dev. Biol.* 2, 8. <http://doi.org/10.1186/1471-213X-2-8>
- Williams C., Mehrian Shai R., Wu Y., Hsu Y.-H., Sitzer T., Spann B., McCleary C., Mo Y., Miller C. A. (2009). Transcriptome analysis of synaptoneurosomes identifies neuroplasticity genes overexpressed in incipient Alzheimer's disease. *PLoS one*, 4(3):e4936.
- Wisniewska, M. B., Nagalski, A., Dabrowski, M., Misztal, K., & Kuznicki, J. (2012). Novel β -catenin target genes identified in thalamic neurons encode modulators of neuronal excitability. *BMC Genomics*, 13(1), 635. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-13-635>
- Wisniewska M. B. (2013). Physiological Role of β -Catenin/TCF Signaling in Neurons of the Adult Brain. *Neurochem. Res.* Epub ahead of print.
- Yanagi K., Kaname T., Wakui K., Hashimoto O., Fukushima Y., & Naritomi K. (2012). Identification of Four Novel Synonymous Substitutions in the X-Linked Genes Neuroligin 3 and Neuroligin 4X in Japanese Patients with Autistic Spectrum Disorder. *Autism Res. Treat.* 2012:5.
- Yasuda R. P., Ikonomic M. D., Sheffield R., Rubin R. T., Wolfe B. B., & Armstrong D. M. (1995). Reduction of AMPA-selective glutamate receptor subunits in the entorhinal cortex of patients with Alzheimer's disease pathology: a biochemical study. *Brain Res.* 678(1-2):161–167.
- Yu X., & Malenka R. C. (2003). Beta-catenin is critical for dendritic morphogenesis. *Nat Neurosci.* 6(11):1169–1177.
- Zhang, H., Liu, X., Zhang, C., Mundo, E., Macciardi, F., Grayson, D. R., Holden, J. J. a. (2002). Reelin gene alleles and susceptibility to autism spectrum disorders. *Mol. Psychiatr.* 7(9), 1012–1017. <http://doi.org/10.1038/sj.mp.4001124>
- Zheng, X., Demirci, F. Y., Barmada, M. M., Richardson, G. A., Lopez, O. L., Sweet, R. A., Feingold, E. (2015). Genome-wide copy-number variation study of psychosis in Alzheimer's disease. *Translational Psychiatr.* 5(6), e574. <http://doi.org/10.1038/tp.2015.64>
- Zhou C. J., Zhao C., and Pleasure S. J. (2004). Wnt signaling mutants have decreased dentate granule cell production and radial glial scaffolding abnormalities. *J Neurosci.* 24:121-126.
- Zoghbi, H. Y., & Bear, M. F. (2012). Synaptic Dysfunction in Neurodevelopmental Intellectual Disabilities. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, 1–22. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a009886>